



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TIAGO SANTOS DA SILVA

**EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO
IMPREVISÍVEL SOBRE O METABOLISMO DA
SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL E SOBRE OS
COMPORTAMENTOS DOS TIPOS ANSIOSO E
DEPRESSIVO EM RATOS ADULTOS**

Vitória

2014

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Vitória, 23 de julho de 2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Espaço reservado aos dados internacionais de catalogação, elaborados pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo.

**EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL SOBRE O
METABOLISMO DA SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA
PERIAQUEDUTAL E SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS TIPOS
ANSIOSO E DEPRESSIVO EM RATOS ADULTOS**

Tiago Santos da Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg (Orientador - UFES)

Profa. Dra. Sâmia Regiane Lourenço Joca (USP-RP)

Profa. Dra. Vanessa Benjamini Harres (UFES)

Prof^a Dr^a Ivanita Stefanon (Coordenadora do PPGCF - UFES)

Vitória, 23 de julho de 2014

Aos meus pais e à Natércia.

AGRADECIMENTOS

A mais tenra e real gratidão a Deus. Sua existência e ação transcendem quaisquer intempéries da vida, fazendo-me aprender um pouco mais. Agradecido a Deus por mais uma conquista.

Aos meus pais, meu carinho, respeito e valor. Grato pelo apoio irrestrito. Sinceros agradecimentos a toda minha família pelos encontros vivificadores. À minha querida Natércia, meu apreço e afago. A mais pura gratidão pelos ensinamentos, companheirismo e paciência. Minhas considerações também aos seus pais por me reforçarem o conceito de vida com longanimidade. Aos demais da família, são memoráveis os bons encontros.

Ao professor Dr. Alexandre Martins Costa Santos, diretor científico do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM/UFES) pela solicitude nos serviços laboratoriais, com devidas considerações às agências financiadoras. Em especial, os mais puros agradecimentos a Me. Natércia Carvalhal Alves, Farmacêutica Bioquímica do LABIOM, pela colaboração e auxílio profissional com esmero, desde as longas horas despendidas no auxílio no preparo de soluções, processamento e leitura de amostras, registros, ajustes e monitoramentos no método CLAE e na espectrofotometria, em horários estendidos e por vezes de refeições inexistentes. Também ao Evaldo Vitor Pereira, Técnico em Química, agradecimentos pelo auxílio técnico. Compartilho o mérito com a equipe e sou grato pelos momentos de aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da UFES (PPGCF) por me permitir conhecer mais da Fisiologia, sobretudo no campo da Neurociência e sua aplicação translacional, com extensão ao laboratório de Neurobiologia dos Transtornos do Humor e da Ansiedade. Cumprimentos devidos à coordenação do PPGCF e ao orientador Dr. Luiz Carlos Schenberg. Congratulações também a Me. Caroline Azevedo Rosa pelo importante auxílio no procedimento *punch* e aos estudantes de iniciação científica que cooperaram para o sucesso deste trabalho.

Aos professores, técnicos, mestrandos e doutorandos dos setores da UFES que me permitiram usar aparelhos, equipamentos e materiais indispensáveis ao protocolo experimental. Ao médico veterinário Rodolpho José da Silva Barros e à equipe técnica do Biotério do CCS/UFES pelo auxílio e incentivo.

Ao Departamento de Psicobiologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e à Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e base imprescindível para todo o meu período de mestrado.

Aos membros da comissão examinadora, sinceros agradecimentos pela contribuição científica.

Por fim, e não menos importante, minha integral consideração aos ratos *Wistar* utilizados.

“Não vos inquieteis, pois, pelo dia de amanhã, porque o dia de amanhã cuidará de si mesmo. Basta a cada dia o seu mal... O coração ansioso deprime o homem...”

Mateus 6:34 e Provérbios 12:25a, Bíblia Sagrada.

ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina ou Serotonina
5-HTT	Transportador de serotonina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AP	Ataque de pânico
APA	Associação americana de psiquiatria
ASI	Ansiedade de separação na infância
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CA	Campo aberto
CE	Choque escapável
CI	Choque inescapável
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CORT	Corticosterona
CPF	Córtex pré-frontal
CPFvm	Córtex pré-frontal ventromedial
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DA	Desamparo aprendido
DSM-IV	4ª versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EBA	Entrada em braços abertos
EBF	Entrada em braços fechados
ECM	Estresse crônico moderado
ECMI	Estresse crônico moderado imprevisível
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GR	Receptores glicocorticóides
HED	Teste hedônico
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
ISN	Isolamento social neonatal
LCE	Labirinto em cruz elevado
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LTE	Labirinto em T elevado

MAO	Monoamina oxidase
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
MCPAdl	Coluna dorsolateral da MCPA
MCPAdm	Coluna dorsomedial da MCPA
MCPAl	Coluna lateral da MCPA
MCPAvl	Coluna ventrolateral da MCPA
MCPD	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPVL	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
MR	Receptores mineralocorticoides
NAc	Núcleo accumbens
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NF	Teste de natação forçada
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMnR	Núcleo mediano da rafe
PET	Tomografia por emissão positrônica
PPS	Preferência por sacarose
PRL	Prolactina
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TBA	Tempo nos braços abertos
TP	Transtorno do pânico
TR-5HT	Taxa de renovação serotoninérgica
Tr-OH	Triptofano hidroxilase
TRP	Triptofano
VPN	Divisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo

ÍNDICE

ÍNDICE	x
RESUMO	1
ABSTRACT	2
REVISÃO	3
1. Abordagem do estresse e de seus hormônios	3
2. Paradigma de estresse crônico moderado	6
3. Respostas depressivas e ansiosas a eventos estressantes	8
4. Sistema serotoninérgico como controlador das situações aversivas	12
5. Matéria cinzenta periaquedutal na expressão de estados emocionais	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
ESTUDO I:	28
EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL SOBRE O METABOLISMO DA SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA EM RATOS ADULTOS	
RESUMO	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAIS E MÉTODOS	33
Animais	33
Procedimentos	33
<i>Paradigma de estresse crônico moderado imprevisível</i>	33
<i>Coleta das amostras de tecido da MCPA</i>	38
<i>Análise dos níveis tissulares de 5-HT, 5-HIAA e da TR-5HT da MCPA</i>	40
<i>Dosagem de proteínas</i>	41
<i>Coleta de Sangue e dosagem hormonal</i>	42
<i>Análise estatística</i>	42
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	46
ESTUDO II:	51

EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL SOBRE OS COMPORTAMENTOS DOS
TIPOS ANSIOSO E DEPRESSIVO EM RATOS ADULTOS

RESUMO	52
INTRODUÇÃO	53
MATERIAIS E MÉTODOS	55
Animais	55
Procedimentos	55
<i>Paradigma de estresse crônico moderado imprevisível</i>	55
<i>Teste hedônico</i>	57
<i>Teste labirinto em cruz elevado</i>	58
<i>Teste campo aberto</i>	59
<i>Teste natação forçada</i>	59
<i>Análise Estatística</i>	60
RESULTADOS.....	61
CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES.....	95

RESUMO

É geralmente aceito que a falta de habilidade em controlar o estresse crônico facilita o desenvolvimento da depressão. Por outro lado, dados epidemiológicos apresentam a depressão com alta comorbidade com o pânico. Ademais, há evidência que sugere ser a serotonina (5-HT) crucial tanto no pânico quanto na depressão. Portanto, aqui nós avaliamos o efeito do estresse crônico moderado imprevisível (ECMI), um presumível modelo de depressão, sobre o metabolismo serotoninérgico na matéria cinzenta periaquedutal no mesencéfalo (MCPA), um presumível substrato do pânico. Ratos expostos ao ECMI foram também avaliados em relação aos níveis basais de depressão (Natação Forçada) e ansiedade (Labirinto em Cruz elevado e Campo aberto). Ratos machos adultos foram sujeitos a 9 dias de ECMI. Um dia posterior, os ratos foram decapitados e seus cérebros foram removidos, incluindo a coleta de amostras de sangue do tronco. Picoteamentos da MCPA dorsal e ventrolateral foram ensaiados para 5-HT e seu principal metabólito, ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA). Níveis plasmáticos de corticosterona foram também ensaiados. Os dados mostraram o não efeito do ECMI tanto nos níveis basais para depressão e ansiedade. Comparado aos controles não estressados, ratos expostos ao ECMI apresentaram significativo aumento nos níveis de 5-HT apenas na MCPD. Embora os níveis de 5-HIAA não diferiram entre os grupos, a taxa de renovação serotoninérgica foi significativamente reduzida na ventrolateral da MCPA. Os pesos dos ratos expostos ao ECMI reduziram significativamente em comparação aos controles a despeito da falta de efeitos nos níveis plasmáticos de corticosterona. Os dados sugerem que o ECMI diferentemente afeta os níveis de 5-HT na MCPA dorsal e ventrolateral.

Palavras-chave: Corticosterona, Estresse Crônico Moderado, Matéria Cinzenta Periaquedutal, Serotonina.

ABSTRACT

It is generally accepted that the inability to control chronic stress facilitates the development of depression. On the other hand, epidemiological data showed that depression is highly comorbid with panic. Moreover, plenty evidence suggests that serotonin (5-HT) is crucial in both panic and depression. Therefore, here we evaluated the effect of unpredictable chronic mild stress (UCMS), a presumptive model of depression, on 5-HT metabolism at the periaqueductal gray matter of the midbrain (PAG), a presumptive substrate of panic. UCMS rats were also evaluated with regard to the baseline levels of depression (forced swimming) and anxiety (elevated plus-maze, open-field). Adult male rats were subjected to a 9-day UCMS. The day after, the rats were decapitated and the brains were removed along with a trunk blood sample. Punches of dorsal and ventrolateral PAG were then assayed for 5-HT and its main metabolite, 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). Corticosterone plasma levels were assayed as well. Data showed no effects of UCMS either in depression or anxiety baseline levels. Compared to non-stressed controls, UCMS rats showed significant increases in 5-HT levels of dorsal PAG only. Although the 5-HIAA levels did not differ among groups, 5-HT turnover was significantly reduced in ventrolateral PAG. UCMS rat weight was significantly reduced relative to controls in spite of the lack of effects in corticosterone plasma levels. Data suggest that UCMS differentially affect 5-HT levels in dorsal and ventrolateral PAG.

Keywords: Corticosterone, Unpredictable Chronic Mild Stress, Periaqueductal Gray Matter, Serotonin.

REVISÃO

1. Abordagem do estresse e de seus hormônios

O conceito de estresse de Hans Selye (1936) ganhou enorme discussão na comunidade científica e se mostrou de grande relevância na prática clínica, com explicitações de uma reação inespecífica e estereotipada do organismo às demandas externa e interna do corpo (Selye e Fortier, 1949). Tais respostas físicas, mentais ou emocionais aos agentes nocivos (estressores) permitem alterações dos limites, até então restritos da variação do sistema fisiológico, o que caracteriza o sentido adaptativo da carga ou sobrecarga alostática frente ao estado homeostático afetado (McEwen e Wingfield, 2003; Peters e McEwen, 2012). De fato, a homeostase é persistentemente desafiada por forças adversas, sendo o estressor o agente causador (estímulo) e o estresse a condição provocada pelo desafio (Selye, 1973).

A inespecificidade reacional do estresse foi atribuída à responsividade aumentada do córtex adrenal, involução timo-linfática e ulcerações gástricas e duodenais, desfecho da apresentação de estímulos ameaçadores como o calor, frio, exercício muscular, anóxia, trauma, infecção e estímulos psicológicos, condição definida como Síndrome Geral da Adaptação (Selye, 1974; Sapolsky, 1992). Segundo a observação de Selye, os eventos nocivos intensos ou prolongados geram uma *reação de alarme*, fase caracterizada por alterações dos níveis pressóricos, da glicemia, do balanço eletrolítico e da permeabilidade da membrana celular, seguida da fase de *resistência*, em que há uma adaptação aos estressores, dado o declínio ou extinção dos sintomas do estresse acompanhado pela estabilidade da concentração elevada de glicocorticóides. Por fim, a sustentação da exposição a estressores severos ou duradouros pode exaurir as defesas do organismo, caracterizando a fase de *exaustão* da Síndrome Geral de Adaptação. Nesta última fase, o reaparecimento sintomático é acompanhado pelo declínio da concentração até então elevada de glicocorticóides, o que pressupõe vulnerabilidade dos órgãos e colapso fisiológico no evento estressante persistente ou de maior magnitude (por exemplo, disfunção imunológica ou gastrointestinal) (Selye, 1936, 1956; Kopin, 1995).

Todavia, estudos posteriores mostraram distintas respostas simpáticas e neuroendócrinas com as variações de intensidades dos diversos tipos de estressores (por exemplo, frio, hemorragia e imobilização), o que pressupõem uma crítica à reação

inespecífica do estresse e sugere que cada estressor possui um perfil neuroendócrino próprio (Mason, 1971; Pacak *et al.*, 1998).

O estresse é caracterizado por aumento da síntese do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na divisão parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (VPN), por aumento de secreções do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) nos corticotropos da adenoipófise e por cortisol ou corticosterona (CORT) na zona fasciculada do córtex da adrenal (Guyton e Hall, 2006; Ulrich-Lai e Herman, 2009). De fato, as atividades do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e do sistema nervoso simpático se mostram pronunciadas, incluindo a liberação de prolactina (PRL), no estresse agudo em humanos e em animais (Neill, 1970; Krulich *et al.*, 1974, Siegel *et al.*, 1980; Mioduszewski *et al.*, 1982; Dijkstra *et al.*, 1992).

Ainda, embora o eixo HHA seja tonicamente inibido pelas aferências hipocampais do VPN, as projeções da amígdala e hipotálamo a este núcleo têm uma função importante nas respostas neuroendócrinas ao estresse (Helmstetter, 1992; Adamec *et al.*, 1999; Kim e Diamond, 2002). Estas estruturas desenvolvem plasticidade neuronal e podem ser responsáveis pela hiperfunção do eixo em diversos transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão e o pânico (Whitnall *et al.*, 1993; Nestler *et al.*, 2002; Erhardt *et al.*, 2006; Krishnan e Nestler, 2008). Possivelmente, a plasticidade é ligada à convergência das aferências do VPN, excitatórias ou inibitórias, à secreção de CRH e à vasopressina, os principais secretagogos do ACTH (Dallman *et al.*, 1987; Antoni *et al.*, 1993; Whitnall *et al.*, 1993). Um exemplo da plasticidade do eixo HHA consiste na observação de que animais submetidos a estresse crônico exibem respostas neuroendócrinas normais, ou até mesmo aumentadas, a um novo estressor, dado o intenso *feedback* negativo pelos níveis elevados de glicocorticóides no estresse crônico (Scribner *et al.*, 1991; Bhatnagar *et al.*, 1995). Curiosamente, estudos têm mostrado que o aumento da secreção de ACTH, devido à aplicação de choques nas patas, é atenuado se os choques forem aplicados na presença de outro rato, induzindo o comportamento de luta (Conner *et al.*, 1971; Erskine e Levine, 1973).

Interessantemente, a ausência da ativação de respostas de PRL e do eixo HHA no estresse inquestionável de um ataque de pânico (AP) tem intrigado a psiquiatria contemporânea (Liebowitz *et al.*, 1985; Levin *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1987; Hollander *et al.*, 1989). De fato, o transtorno do pânico (TP) tem sido apontado

como distinto dos transtornos do estresse, ainda que caracterizado pelo inegável estresse emocional do AP (Schenberg, 2010). Todavia, transtornos psiquiátricos na vida adulta podem ser decorrentes de adversidades no período infantil, que precocemente suscitam ajustes no eixo HHA (Bowlby, 1983; Kaufman *et al.*, 2000; Shelton, 2007). De fato, estruturas prosencefálicas, incluindo o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo, amígdala, septo e fibras nervosas transportadoras dos estímulos sensoriais, projetam eferências, inclusive polissinápticas, que convergem para o VPN, componente de ação integradora da resposta ao estresse apresentado (López *et al.*, 1999; Tsigos e Chrousos, 2002).

Por outro lado, a liberação de CORT parece mediar todo o processo de enfrentamento das adversidades (Deakin e Graeff 1991; Garmezy, 1991; Pinheiro 2004). De fato, a secreção de CORT tem ação permissiva no ajuste do limiar de ativação do eixo HHA, na manutenção de sua atividade basal e inicialização da defesa do organismo (*priming*), valendo-se do aporte energético do metabolismo lipídico e da glicose por ação das catecolaminas, expressão pronunciada de receptores da inflamação (*up-regulation*), além dos processos atencionais, integração das informações de distintas modalidades sensoriais e tomada de decisão frente às ameaças dos estressores (Gray, 1991; Buckingham, 2006). No contexto de estresse, é assegurada a mobilização protéica dos músculos estriados esqueléticos e ácidos graxos do tecido adiposo para a neoglicogênese, com elevado depósito de glicogênio hepático paralelamente à atividade glicolítica dos hormônios adrenalina e glucagon, além do preparo cardiovascular mediante ação das catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) a uma eventual sobrecarga (Hayden-Hixson e Nemeroff, 1993; Akil e Morano, 1995; Stratakis e Chrousos, 1995; Lupien e Meaney, 1998; McEwen, 2000; Tsigos e Chrousos, 2002). A secreção de CORT viabiliza a ação protetora ou supressora na fase adaptativa ou de recuperação, evidenciando-se os efeitos antiinflamatório e imunossupressor (Buckingham, 2006). Ainda, o metabolismo é redirecionado para situações relevantes no estresse, por exemplo, para as demandas energéticas e processos cognitivos, em detrimento das funções reprodutivas ou do crescimento (Gray, 1991; Anisman 2009; Rodrigues *et al.*, 2009). Contudo, o estresse crônico pode estar associado a transtornos metabólicos, podendo alterar a homeostase energética (Bartolomucci *et al.*, 2009).

Por fim, o efeito regulador permissivo do eixo HHA ao estresse é definido pela responsividade ao menor aporte de CORT nos receptores mineralocorticóides (MR ou receptor tipo I), de alta afinidade e especificidade e em

regiões hipocampo-septais, para a manutenção da atividade basal do eixo; enquanto o efeito protetor do eixo HHA é definido pelo maior aporte de CORT nos receptores glicocorticóides (GR ou receptor tipo II), de baixa afinidade e nas estruturas encefálicas hipocampo, amígdala, hipotálamo e hipófise em situações estressantes, respectivamente (Reul *et al.*, 1989; McEwen, 1991; De Kloet, 1995; De Kloet *et al.*, 1998; Gesing *et al.*, 2001; Galon *et al.*, 2002; Buckingham, 2006; Chrousos, 2007; Einarsson *et al.*, 2008).

2. Paradigma de estresse crônico moderado

O paradigma de estresse crônico moderado (ECM) tem sua origem nas observações de Katz (1982), em que ratos reduziam a ingestão de soluções doces, inferida como *deficit* hedônico, após exposição prolongada a distintos estressores (Katz, Schmaltz, 1980; Katz *et al.*, 1981). A versão original do paradigma foi modificada por Willner (1987) que buscou a exposição a estressores amenos, como a restrição de água e comida, alteração da temperatura ambiental, iluminação contínua ou inclinação da gaiola-casa, o que induziu menor responsividade (ingestão e preferência) à solução de sacarose (Willner *et al.*, 1992; Willner, 1997; Willner e Papp, 1997; Willner, 2005).

Modelos de ECM com apresentações imprevisíveis dos estressores têm sido resultantes de adaptações de outras versões experimentais (Willner *et al.*, 1987; Papp *et al.*, 1994; Lucca *et al.*, 2008). A apresentação imprevisível de novos estressores de intensidade moderada enseja a designação estresse crônico moderado imprevisível (ECMI), inclusive com impactos neurofisiológicos e respostas anedônicas (Willner *et al.*, 1987; Anisman e Matheson, 2005; Manoli *et al.*, 2000; Mitchell e Baker, 2010; Wright e Panksepp, 2011). O modelo é exemplificado por uma duração do estresse de até 20 h por estressor moderado, diferentes combinações de estressores apresentados no dia (de apenas um estressor a um conjunto deles), apresentação semirandômica ou imprevisível dos estressores, variados elementos de estresse (por exemplo, restrição de alimento, gaiola suja e ruído), diferentes períodos de protocolo experimental (por exemplo, de 1 a 9 semanas de estresse moderado ou apresentação de intermitentes estressores por 40 dias) e respostas anedônicas encontradas (menor ingestão de sacarose) (Willner *et al.*, 1987; Willner *et al.*, 1992; Manoli *et al.*, 2000).

Ademais, os estímulos estressores podem ser classificados em físicos (calor, frio, radiação intensa, barulho, vibração), químicos (substâncias tóxicas e algésicas), psicológicos (capazes de gerar ansiedade, medo e frustração), sociais (ambiente hostil e rompimento de relações) e alteradores da homeostase (exercício, ortostase, inclinação corporal, hipoglicemia e hemorragia) (Pestana, 2010). Quanto à duração da exposição do evento estressante, os estressores podem ser agudos (único, intermitente, exposição em tempo limitado) ou crônicos (exposição prolongada e intermitente, ou exposição contínua) (Pacák e Palkovits, 2001). A imprevisibilidade dos estímulos, os tipos de estressores, variações na duração da exposição e da intensidade dos eventos estressantes podem gerar respostas fisiológicas diferenciadas (Puglisi-Allegra *et al.*, 1991). De fato, repercussões patológicas parecem estar mais associadas com o estresse crônico, em que há maior exigência dos mecanismos homeostáticos na hiperexposição do organismo aos agentes estressores (McEwen e Magarinos, 1997; Buckingham, 2006; Goldstein, 2010; Abelaira *et al.*, 2013).

Em animais, embora estudos tenham apontado a hiporresponsividade nos jovens ao estresse, caracterizada por níveis basais ou respostas brandas de CORT, o estresse moderado pela injeção de salina após 24 h de separação maternal provocou sensibilidade dos filhotes ao evento estressor (Schapiro *et al.*, 1962; Levine, 1994, 2001, 2002). Adicionalmente, enquanto os filhotes submetidos ao estresse de separação maternal breve (3-15 min) apresentam respostas neuroendócrinas atenuadas na vida adulta, filhotes submetidos ao mesmo por períodos prolongados (24 h) apresentam respostas exageradas, tanto durante o período hiporresponsivo ao estresse (nas duas semanas de vida) quanto na vida adulta (Walker *et al.*, 1986; Suchecki *et al.*, 1993; Forbes *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 2000; Levine, 2001, 2002; Lippmann *et al.* 2007). Notavelmente, como o CRH é subregulado nos filhotes privados da mãe, a hiperfunção do eixo HHA nestes filhotes deve-se, aparentemente, à vasopressina (Levine, 2001). Henningsen e colaboradores (2012) mostram que ratos desprovidos de cuidado maternal são mais propensos a uma condição anedônica após estresse e que há um aumento de metabólitos de CORT fecal após exposição ao ECM.

Assim, a exposição repetida de estressores de intensidade moderada pode produzir atenuação da responsividade do eixo HHA (adaptação ou habituação), contudo um novo estressor pode suscitar aumento da resposta do eixo (sensibilização) como mecanismo adaptativo (Weiberg *et al.*, 2009). Tal adaptação é dependente dos fatores

variabilidade individual, modalidade do estressor, intensidade do estresse e o intervalo de tempo entre as sessões estressoras do estresse crônico (Lachuer *et al.*, 1994). Em humanos, Bowlby (1983) mostra que o funcionamento do eixo HHA pode ser ajustado em idade bastante precoce, corroborando a associação frequente de adversidades na infância e transtornos psiquiátricos na vida adulta.

Por fim, o modelo ECM responde seletivamente a drogas antidepressivas, sem efeito em animais não estressados (D'Áquila *et al.*, 1997). De fato, o paradigma ECM implica o estresse crônico como a causa principal da depressão (Willner e Papp, 1997). Como no tratamento clínico em humanos, os comportamentos do tipo depressivo dos animais somente são reparados após 3 a 4 semanas de tratamento com antidepressivos (Bourin *et al.*, 2001; Gambarana *et al.*, 2003; Pijlman *et al.*, 2003; Bekris *et al.*, 2005; Willner, 2005).

3. Respostas depressivas e ansiosas a eventos estressantes

O impacto do estresse depende do tipo do estressor que o organismo está sendo exposto (crônico ou agudo, controlável ou incontrolável), das condições do indivíduo afetado, da responsividade ao problema e do histórico de eventos estressantes (Anisman e Merali, 1999; Paykel, 2001). A incontrolabilidade no estresse crônico pode facilitar o desenvolvimento da depressão, inclusive com evidências epidemiológicas das respostas e sintomas do transtorno depressivo (Maier, 1984; Kendler *et al.*, 1999; Alfonso *et al.*, 2005; Henn e Vollmayr, 2005; Maier e Watkins, 2005, 2010; Czéh *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2006; Hammack *et al.*, 2012).

Segundo Pestana (2010), estima-se que mais de 150 milhões de pessoas no mundo experimentem algum episódio depressivo em algum momento da vida. Dos pacientes deprimidos, 2 a 3 % requerem hospitalização, com sérios prejuízos das atividades diárias (Guimarães, 2000). De fato, a depressão acomete pessoas de todas as etnias, classes socioeconômicas e idades, sendo prejudicial às relações interpessoais e pode apresentar comorbidade com outras doenças neurológicas e psiquiátricas, como a ansiedade, que também limita as atividades normais do indivíduo (Gotlib e Joormann, 2010; Brhlikova *et al.*, 2011). Em cerca de 60 % dos casos de depressão, os episódios depressivos são precedidos pela ocorrência de fatores estressantes (Post, 1992). Além

disso, a conhecida influência de fatores genéticos no desenvolvimento da depressão poderia ser decorrente de um aumento da sensibilidade a eventos estressantes (Kendler *et al.*, 1995). A cronicidade e a recorrência dos transtornos do humor, como a depressão, levam os indivíduos a grandes perdas no exercício diário de suas atividades (Uebelacker *et al.*, 2004).

O transtorno depressivo é visto como uma doença incapacitante que ameaça a qualidade de vida do ser humano (Duman, 2010). De etiologia genética, bioquímica, psicológica e sócio-ambiental, seus fatores isolados ou combinados predis põem vulnerabilidades ao indivíduo (Bienvenu *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2000; Davidson, 2011). Segundo a quarta versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), além do humor disfórico, o paciente depressivo apresenta perda de interesse ou prazer em praticamente todas as atividades (sintomas anedônicos) e com exibição de pelo menos quatro sintomas adicionais por um período mínimo de duas semanas (APA, 1994; Kessler *et al.*, 2005; Davidson, 2011). De fato, pacientes com depressão maior exibem perda de energia e de interesse, dificuldades na concentração, retardos psicomotores, pensamentos recorrentes de morte e tentativas frequentes de suicídio (Charney e Manji, 2004; Harvey *et al.*, 2004; Dinan e Scott, 2005; Hihn *et al.*, 2006; Kennedy, 2008).

Agentes estressores constituem um risco para o desenvolvimento de transtornos depressivos, como os fatores psicológicos (por exemplo, problemas sociais), que podem induzir a mudanças significativas comportamentais e fisiológicas (McEwen, 1998; Charney e Manji, 2004; Akhtar-Danesh e Landeen, 2007; Klauke *et al.*, 2010). Segundo de Kloet e colaboradores (2005), eventos estressantes e traumáticos ao longo da vida influenciam no desenvolvimento da depressão e parecem prejudicar pacientes deprimidos na elaboração de estratégias de enfrentamento nas situações aversivas. Por outro lado, o estresse crônico pode estar também envolvido na origem de transtornos de ansiedade, transtornos alimentares e alterações na formação de memórias (Chrousos, 2007; Li *et al.*, 2008; Buynitsky e Mostofsky, 2009; Epel, 2009).

Sigmund Freud (1896) foi pioneiro em descrever os transtornos de ansiedade. Freud (1896) distinguiu a expectativa ansiosa ou apreensão do ataque de ansiedade, duas síndromes fundamentais da ansiedade e de sinais e sintomas similares aos atuais diagnósticos de transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do

pânico (TP), respectivamente (APA, 2000). Pelos estudos de Freud, enquanto a expectativa ansiosa consiste de uma ansiedade livre e flutuante que controla a escolha de idéias por antecipação, os ataques de ansiedade consistem de uma ansiedade que irrompe subitamente na consciência sem ter sido evocada por qualquer idéia (Freud, 1896). Ademais, a combinação de fatores genéticos, experiências estressantes e estresse por períodos prolongados determinam a resposta do indivíduo a situações novas de estresse e sua vulnerabilidade aos transtornos psiquiátricos, incluindo transtornos de ansiedade como o TP (Charney e Manji, 2004).

Em animais, a exposição aos eventos estressantes frequentemente suscita mudanças comportamentais semelhantes ao que ocorre em humanos com depressão, inclusive com alterações neuroquímicas e neuroendócrinas (Willner, 1997; Sapolsky, 2003; Rodrigues *et al.*, 2009). Adicionalmente, aos testes comportamentais utilizados, há evidência de diminuição da atividade exploratória de animais expostos previamente ao estresse crônico e são também observados os efeitos lesivos do estresse sobre a memória espacial (Garcia-Marquez e Armario, 1987; Bodnoff *et al.*, 1995; Conrad *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 1999). Tamanha responsividade, animais expostos ao estresse crônico variado, estresse moderado ou estresse agudo podem sofrer uma severa perda de peso corporal (Harris *et al.*, 1998, 2002; Gamaro *et al.*, 2003).

Ainda, o sistema dopaminérgico mesolímbico, envolvido nos comportamentos relacionados à recompensa, tem sido considerado nas respostas estressoras e no tratamento com antidepressivos (D'Aquila *et al.*, 2000; Robinson e Berridge, 2000; Nestler, 2002; Schultz, 2002; Wise, 2002; Borges *et al.*, 2013). De fato, ratos submetidos ao ECM apresentam diminuição na liberação basal de dopamina, neurotransmissor monoaminérgico envolvido também no controle do humor (Gambarana *et al.*, 2003). Segundo Borges e colaboradores (2013), os comportamentos emocional e social afetados pelo estresse, associados à redução drástica na transmissão dopaminérgica mesolímbica, foram revertidos pela administração oral de ácido L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Adicionalmente, estudos têm mostrado a redução na expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo após estresse agudo ou crônico, o que representa um *deficit* na principal neurotrofina no cérebro e potencial mediador neurobiológico dos efeitos das experiências de vida (Nestler *et al.*, 2002; Krishnan e Nestler, 2008). O estresse de privação maternal, por exemplo, altera a expressão não só de BDNF, mas de vários outros peptídeos do

hipocampo, incluindo a sinaptosina, o fator neurotrófico neuronal, neurotrofina-3 e substância P (Unger *et al.*, 1988; Rosén *et al.*, 1992; Brodin *et al.*, 1994; Rupniak *et al.*, 2000; Roceri *et al.*, 2002; Andersen e Teicher, 2004; Marais *et al.*, 2009).

No mesmo sentido, Bessa e colaboradores (2013) observaram que animais expostos ao ECM disparam comportamentos anedônicos, sofreram hipertrofia dos neurônios médio espinhosos do núcleo *accumbens* (NAc), inclusive com aumento na expressão de genes codificadores de BDNF e proteína sinapsina I. Além disso, houve a reversão da anedonia por antidepressivos (imipramina e fluoxetina), situação associada com a reversão efetiva das alterações específicas na morfologia e no perfil de expressão gênica do NAc (Bessa *et al.*, 2013). Há diferentes padrões comportamentais, respostas neuroquímicas e farmacológicas entre os animais expostos ao estresse agudo e os submetidos ao estresse crônico, inclusive podendo haver alteração da sensibilidade, do número de receptores α_2 -adrenérgicos e da atividade noradrenérgica central no estresse prolongado (Flügge *et al.*, 1992, 1996; Cancela *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 2001).

Em humanos, o funcionamento anormal do sistema noradrenérgico tem sido considerado nas reações agudas de estresse, em estresse crônico psicossocial, nos transtornos de estresse pós-traumático, além da depressão e ansiedade (Charney *et al.*, 1984; Flügge *et al.*, 1992, 1996; Southwick *et al.*, 1999; Anand e Charney, 2000; Heilbronner *et al.*, 2004). Como no estresse, há hiperatividade do eixo HHA e posterior hipersecreção de CRH e CORT em grande parte dos pacientes com depressão (Hatzinger, 2000; Parker *et al.*, 2003).

Quanto às respostas do tipo ansiosas ao evento estressante, estudos em animais têm revelado que a ansiedade é indutora de uma forma particular de inibição comportamental em situações de responsividade aos eventos novos ambientais não recompensadores (em condições em que é esperada a recompensa) ou punitivos (Rang *et al.*, 2003). Tal inibição pode ser exibida na imobilidade ou supressão de uma resposta comportamental (Rang *et al.*, 2003). De fato, a ansiedade elicitou ou intensificou respostas às ameaças ambientais (File, 1988). Indubitavelmente, a exposição de ratos adultos e primatas ao estresse crônico pode resultar em danos cognitivos no desempenho de distintas tarefas, tais como labirinto radial de oito braços e labirinto aquático (Bodnoff *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1999).

Ademais, o efeito ansiogênico do estresse em animais também é apontado no teste labirinto em cruz elevado (LCE), em que são observados a diminuição do número de entradas nos braços abertos e o comportamento de congelamento (*freezing*) (File, 1996; Padovan *et al.*, 2000; Zurita *et al.*, 2000). A ansiedade é provocada pelo conflito entre a motivação de explorar e a aversão aos braços abertos (Carobrez e Bertoglio, 2005). Adicionalmente, a atividade exploratória no teste campo aberto (CA) tem sido alterada nos animais cronicamente estressados (D'Aquila *et al.*, 2000). O estresse crônico variável pode induzir a redução significativa no consumo de alimento doce, situação revertida pela administração de fluoxetina, um inibidor seletivo de receptação da serotonina (Gamaro, 1998; Willner, 2005). Ainda, o comportamento de imobilidade no teste de natação forçada (NF) reflete um estado depressivo nos animais (Porsolt *et al.*, 1977).

Em estudos com animais sobre hedonia, o consumo de sacarose 1 % tanto pelos ratos *Lister hooded* quanto nos ratos *Long-Evans* foi suprimido após exposição dos animais ao ECM, resultando em um estado anedônico claro (Willner *et al.*, 1992). A concentração utilizada pelos autores foi referida como adequada à função ingestão-concentração na curva em U invertido (Willner *et al.*, 1992). No mesmo sentido, segundo Pucilowski e colaboradores (1993), o ECM em ratos *Flinders* reduziu significativamente a ingestão e a preferência por solução de sacarina nos animais sensitivos em comparação aos ratos resistentes. Ademais, o estresse pré-natal ou exposição a elevado nível de glicocorticóides no período intrauterino pode suscitar além do pronunciado comportamento anedônico, aumento no tempo de imobilidade no teste NF e prejuízos na interação social em diferentes estágios da vida dos animais (Borges *et al.*, 2013). Interessantemente, Henningsen e colaboradores (2013) mostram que a estimulação eletroconvulsiva repetitiva pode reverter tanto o *deficit* da memória operacional quanto o estado anedônico de ratos submetidos ao ECM. De fato, a apresentação de estresse crônico leve e variado tem envolvido fatores estressantes naturalísticos proporcionais ao estresse humano diário (Gronli *et al.*, 2006).

4. Sistema serotoninérgico como controlador das situações aversivas

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é um neurotransmissor da classe das indolaminas e está envolvida na regulação de uma ampla variedade de

funções fisiológicas em sistemas neurais e extraneurais (Brodie e Shore, 1957; Jacobs e Azmitia, 1992). De fato, a sinalização serotoninérgica influencia, por exemplo, as funções neuroendócrinas que envolvem o ritmo circadiano, a atividade reprodutiva, sono e o consumo de alimentos (Martinowich e Lu, 2008). Durante o desenvolvimento embrionário humano, a 5-HT é um dos primeiros neurotransmissores a se constituir, sendo notado já na 5ª semana de gestação (Sundström *et al.*, 1993). Já em animais, Dahlstrom e Fuxe (1964) foram os primeiros a mapear, no encéfalo de ratos, os núcleos específicos contendo 5-HT. Segundo Lesch (2001), esse neurotransmissor exerce uma função importante no desenvolvimento, na funcionalidade e na plasticidade do encéfalo (Lesch, 2001).

A síntese de 5-HT é feita a partir do aminoácido essencial aromático L-triptofano (TRP) que é transportado para o interior da célula por um mecanismo carreador neutro para aminoácidos (Kruk e Pycock, 1991; Brunton *et al.*, 2012) (Figura 1). Ainda, o TRP é hidrolisado pela ação da enzima triptofano hidroxilase (Tr-OH), a primeira enzima da cadeia de síntese e que atua como uma etapa regulatória de todo o processo, após uma necessária estimulação neural e na presença de O₂ e tetrahidrobiopterina (Kruk e Pycock, 1991; Frazer e Hensler, 1994; Brunton *et al.*, 2012). Em condições fisiológicas, a atividade da Tr-OH não é saturável e a concentração de TRP livre no plasma é o principal determinante da síntese de 5-HT (Fernstrom e Wurtman, 1972; Chaouloff *et al.*, 1985; Fadda, 2000; Brunton *et al.*, 2012). O 5-hidroxi-L-triptofano, resultante da hidrólise, sofre descarboxilação pela enzima 5-hidroxi triptofano descarboxilase na presença do cofator piridoxalfosfato, formando a 5-HT (Brunton *et al.*, 2012). Por fim, a metabolização de 5-HT pela enzima monoamina oxidase (MAO), na presença de O₂ e H₂O, resulta em seu maior metabólito, um catabólito primário inativo, denominado ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Kruk e Pycock, 1991; Brunton *et al.*, 2012) (Figura 1).

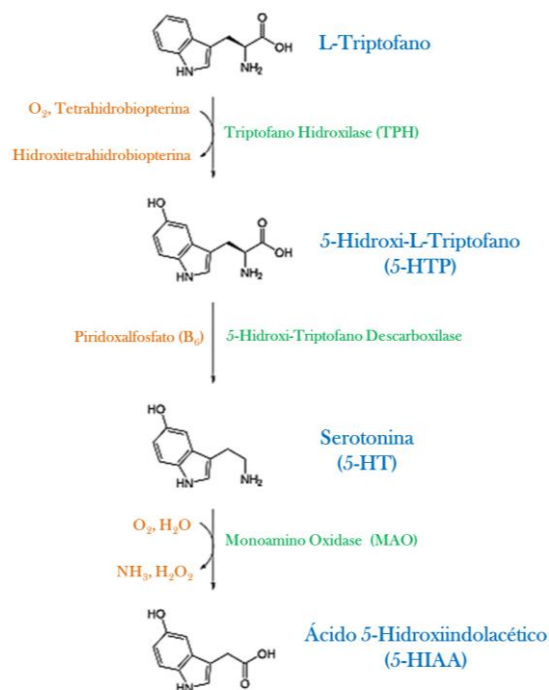


Figura 1 - Síntese de serotonina (5-HT) a partir do seu aminoácido precursor triptofano. TPH, triptofano hidroxilase; 5-HTP, 5-Hidroxi-L-Triptofano; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético; MAO, Monoamina oxidase. Modificado de Brunton e colaboradores (2012).

Adicionalmente, os circuitos córtico-límbicos (hipocampo, neocórtex, amígdala, cerebelo e hipotálamo) possuem uma função importante na modulação da afetividade e da emoção e têm na 5-HT um importante elemento nessa circuitaria, o que inclui seu transportador (5-HTT) envolvido no principal mecanismo de recaptação pré-sináptica de 5-HT da fenda sináptica para modular a neurotransmissão serotoninérgica (Bortoluzzi, 2012). Assim, o 5-HTT regula a concentração extracelular do neurotransmissor, influenciando a neurotransmissão serotoninérgica (Tang *et al.*, 2013). Ainda, 5-HTT é pertencente à família dos transportadores carreadores de soluto dependente de íons sódio e cloro (Na^+/Cl^-) (Haddley *et al.*, 2012). Segundo Haddley e colaboradores (2012), o 5-HTT é um regulador chave da biodisponibilidade da 5-HT e, portanto, qualquer modulação na expressão ou ação do transportador pode resultar em consequências sobre o comportamento, o que o torna um alvo para intervenção farmacêutica em distúrbios do comportamento e do humor (Haddley *et al.*, 2012). Maron e colaboradores (2004) observaram que a atividade do 5-HTT correlacionou-se negativamente com a severidade dos sintomas em pacientes com TP. Interessantemente,

Tang e colaboradores (2013) mostraram que mudanças diferenciais na expressão de 5-HTT podem contribuir para as variações na suscetibilidade à anedonia e associam a redução na expressão do transportador no hipocampo de animais ao estado comportamental induzido pelo ECMI. O fenômeno *down-regulation* da expressão de 5-HTT no hipocampo foi tido como um registro da anedonia em um endofenótipo chave da depressão clínica (Tang *et al.*, 2013).

O sistema serotoninérgico possui mais de 14 tipos de receptores pré-sinápticos e/ou pós-sinápticos distribuídos em sete classes distintas de receptores (5-HT₁₋₇), complexidade e diversidade consideradas na ativação dos seus receptores e que pode produzir efeitos opostos, dificultando a compreensão de sua função nos transtornos do humor e da ansiedade (Hoyer *et al.*, 2002). Alguns são responsáveis por ativar proteínas ligadoras de GTP (transdutoras de sinal) que são acopladas positiva ou negativamente na via de sinalização da adenilato ciclase, enquanto outros receptores da 5-HT ativam a fosfolipase C, resultando na produção de inositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol (Mattson *et al.*, 2004). Os três principais subtipos de receptores 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₃ são, somente, 25 % homólogos (Peroutka e Howell, 1994). Os principais subtipos exibem heterogeneidade e, também, são subdivididos dentro de 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, entre outros (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008). A 5-HT pode ser reciclada dentro de vesículas secretórias via transportador de monoamina vesicular (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008) (Figura 2). Embora os padrões de expressão do receptor de 5-HT em neurônios individuais não têm sido totalmente elucidados, é provável que vários subtipos de receptores 5-HT, com ações semelhantes ou opostas são expressos em neurônios individuais, conduzindo a uma amplitude de ações (Brunton *et al.*, 2012).

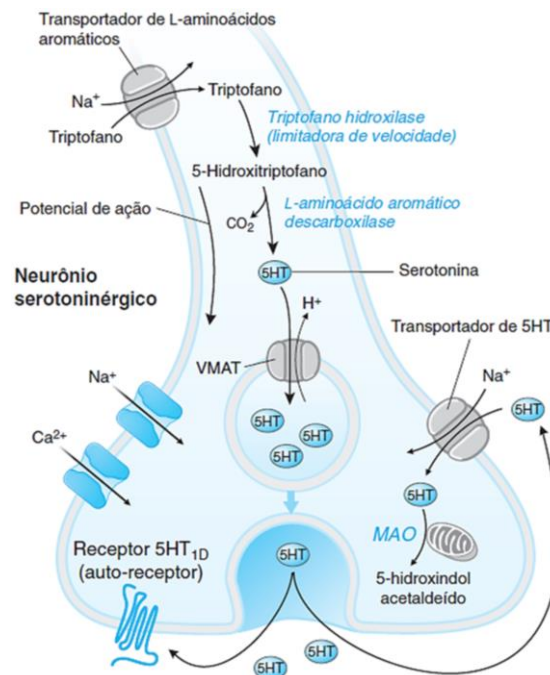


Figura 2 – Regulação pré-sináptica da neurotransmissão da serotonina. A serotonina (5HT) é sintetizada a partir do triptofano em uma via de duas reações; a enzima que limita a velocidade é a triptofano hidroxilase. Tanto a 5HT recém-sintetizada quanto a reciclada são transportadas do citoplasma para o interior de vesículas sinápticas pelo transportador de monoaminas vesicular (VMAT). A neurotransmissão é iniciada por um potencial de ação no neurônio pré-sináptico, que acaba produzindo a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática, por um processo dependente de Ca^{2+} . A 5HT é removida da fenda sináptica por um transportador seletivo de 5HT, bem como por transportadores não-seletivos de recaptção (não indicados). A 5HT pode estimular os autorreceptores 5HT_{1D} , proporcionando uma inibição por retroalimentação. A 5HT citoplasmática é sequestrada em vesículas sinápticas pelo VMAT ou degradada pela MAO mitocondrial. Golan e colaboradores (2009).

A 5-HT também tem sido estudada em situações de estresse, inclusive com evidência de alterações nas concentrações de 5-HT e de 5-HIAA em ratos expostos ao estresse físico exaustivo (Newsholme, 1987; Blomstrand *et al.*, 1989; Bailey *et al.*, 1993; Soares *et al.*, 2003, 2004, 2007). Adicionalmente, foi observado um aumento nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres e de TRP no estado de fadiga pelo estresse físico (Soares *et al.*, 2003, 2004, 2007). Esses resultados sugerem aumentos da síntese e da degradação de 5-HT na submissão de ratos ao estresse físico, corroborado por outros autores (Chaoulouff *et al.*, 1985, 1986). Se prolongado, o evento estressor físico pode suscitar um aumento na concentração plasmática de TRP livre e, desse modo, gerar um aumento na síntese de 5-HT (Chaoulouff, 1997). Acerca da taxa de renovação serotoninérgica (TR-5-HT), *turnover* serotoninérgico ou simplesmente razão 5-HIAA/5-HT, Gamaro e colaboradores (2003) encontraram seu aumento no hipocampo

de ratos expostos ao estresse crônico variado. Adicionalmente, outros autores observaram níveis elevados de 5-HIAA na área pré-óptica, amígdala, hipocampo, córtex entorrinal e medula espinhal, além de valores elevados do *turnover* serotoninérgico no mesencéfalo e medula espinhal de ratos sob estresse de subordinação aos ratos dominantes (Blanchard *et al.*, 1991).

Tem sido postulada a ação sinérgica da 5-HT com o glutamato, numa interação pré-sináptica e pós-sináptica com o glutamato liberado pelo evento estressor ou pelos glicocorticóides, potencializando a ligação aos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e sua subsequente atividade (McEwen, 2000).

Adicionalmente, a 5-HT parece mediar os efeitos da luz sobre a temporização e estímulos não fóticos, sendo assim atuante no processo de sincronização de ritmos (Zatz e Herkenham, 1981; Mistlberger e Antle, 1998). Tal consideração é também importante nos protocolos de estresse, visto que os ritmos circadianos constituem aspectos de quase todos os organismos vivos e alguns possuem caráter endógeno, como o ritmo de ingestão de líquido, gerado por osciladores internos e sincronizado por fatores fisiológicos internos e eventos ambientais externos (Marques e Menna-Barreto, 1997). Adicionalmente, o núcleo supraquiasmático é considerado o principal oscilador endógeno do sistema de temporização circadiano em mamíferos (Morin, 1992). Além da relação com o ciclo sono-vigília, o nível extracelular de 5-HT nos núcleos da rafe também está associado com o estado comportamental e a atividade motora dos animais, já que em áreas prosencefálicas foi observada a liberação de 5-HT associada à ativação comportamental e ao estado de alerta (Rueter e Jacobs, 1996). Segundo Pinato e colaboradores (2004), os níveis de 5-HT do núcleo da rafe de ratos apresentam variações rítmicas ao longo do dia, com concentrações mais altas na fase de escuro, período considerado como de atividade dos animais e com nível máximo às 21 h e mínimo às 5 h.

Ainda sobre a importante associação do estresse às alterações de 5-HT, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam prejuízos do estresse no sistema serotoninérgico, em que os glicocorticóides diminuem a expressão de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} pós-sinápticos no hipocampo e no córtex cerebral, estruturas envolvidas nos estados de depressão e ansiedade (Flügge 1995, Nishi e Azmitia, 1996; Meijer *et al.*, 1997; Carrasco e Van de Kar, 2003). Adicionalmente, o aumento de 5-HT no tratamento com

antidepressivo, na remissão clínica de um episódio depressivo, reverte anomalias do eixo HHA (Belmaker *et al.*, 2008). Segundo Nordquist e Orelan (2010), a dupla ação da 5-HT, quais sejam, como neurotransmissor e como fator neurotrófico, pode gerar um impacto significativo no comportamento e no risco para o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, explicado pelas alterações durante o desenvolvimento da neurocircuitaria límbica envolvida no processamento emocional e durante o desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos no crescimento encefálico inicial.

Se por um lado o ser humano ou animais podem ser expostos ao evento estressante, por outro, a capacidade de enfrentar as adversidades, de sustentar a habilidade adaptativa, de transformar-se por elas e a capacidade de superação do estresse é conhecido como resiliência (Pinheiro, 2004; Gomerzy, 1991). É hipotetizada que a elevação de glicocorticóides no estresse crônico pode elicitar a subregulação de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, gerando um lapso na resiliência e podendo desencadear um estado depressivo (Deakin e Graeff, 1991). Segundo Boere (2001), o ambiente não apropriado às necessidades sociais e físicas pode suscitar respostas não adaptativas, expressas em transtornos comportamentais, identificadas por comportamentos estereotipados, distúrbios emocionais (como agressividade e depressão) e *deficit* cognitivo.

Por fim, tal dimensão do sistema serotoninérgico permite a influência da 5-HT em uma multiplicidade de funções cerebrais, como percepção sensorial, atividade motora, nocicepção, regulação da temperatura, apetite e secreção de hormônios (Brunton *et al.*, 2012). Contudo, se porventura houver situações de carga ou sobrecarga alostática, como em situações estressantes ou ameaçadoras, a amplitude de ações do sistema serotoninérgico atribui à 5-HT a especialização no controle dos estados aversivos (Deakin e Graeff, 1991).

5. Matéria cinzenta periaquedutal na expressão de estados emocionais

A aparência indiferenciada da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) e a sua relativa estabilidade evolutiva sugerem que a estrutura esteja envolvida em funções importantes de proteção e na regulação homeostática (Carrive, 1993). Ademais, as conexões da MCPA sugerem sua participação na expressão dos estados emocionais,

inclusive com envolvimento nos comportamentos defensivos e na analgesia (Carrive, 1993).

Alguns autores propõem a subdivisão rostro-caudal da MCPA nas regiões rostral, intermediária e caudal, inclusive com parcelamento rostral e caudal do segmento intermediário (Bandler *et al.*, 1991). Ao longo do eixo rostro-caudal, a organização colunar da MCPA também foi expressa em estudos anatômicos e funcionais, sobretudo com importância nas funções integrativas em coordenar respostas defensivas (Bandler e Keay, 1996). Em animais, como nos gatos e ratos, a organização da MCPA é vista em colunas morfofuncionais dispostas ao longo do aqueduto, quais sejam, as colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral (MCPAdl), lateral (MCPAl), que constituem a porção dorsal da estrutura mesencefálica (MCPD), e a coluna ventrolateral (MCPAvl) que estabelece a porção ventral da MCPA (MCPVL) (Carrive, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004) (Figura 3). Em humanos, a organização colunar da MCPA também foi confirmada (Parvizi *et al.*, 2000).

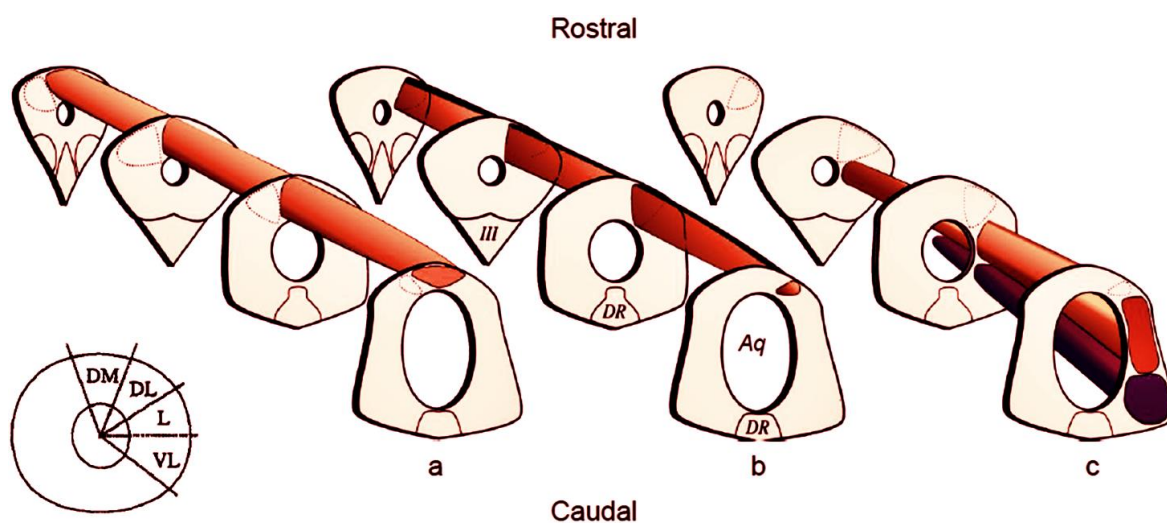


Figura 3 - Organização colunar rostro-caudal da MCPA. As figuras ilustram as colunas: a, dorsomedial (DM); b, dorsolateral (DL); c, lateral (L, na coluna superior) e ventrolateral (VL, na coluna inferior). Aq, aqueduto cerebral; DR, núcleo dorsal da rafe; III, núcleo óculo-motor. Adaptado de Carrive (1993).

As informações ascendentes e descendentes no organismo convergem na MCPA, atuando como estrutura receptora de aferências diretas da medula espinhal e do

núcleo do trigêmeo e indicando função de processamento dos estímulos somatossensoriais, provavelmente de natureza nociceptiva (Carrive, 1993; Bittencourt, 2003). Além disso, a MCPA está conectada a uma série de regiões prosencefálicas que estão relacionadas ao comportamento emocional, como o córtex, amígdala, núcleo do leito da estria terminal e hipotálamo (Carrive, 1993; Bittencourt, 2003). Embora não seja considerado como parte intrínseca da MCPA, o núcleo dorsal da rafe (NDR) se situa na região ventromedial ao aqueduto, onde se forma um grande número de projeções serotonérgicas ascendentes tanto para a MCPA e a amígdala, quanto para amplas áreas do prosencéfalo, incluindo o estriado e CPF (Kosofsky and Molliver, 1987).

Interessantemente, o envolvimento das estruturas subcorticais nas reações emocionais, primeiramente sugerido por Goltz (1892), continua sendo desafiador, como o estudo das respostas defensivas dos animais à estimulação elétrica e química da MCPA ou de estruturas mais rostrais, como hipotálamo e amígdala, nos mais distintos protocolos experimentais (Hunsperger *et al.*, 1956; Sudré *et al.*, 1993; Bandler e Keay, 1996; Vargas *et al.*, 2000; Schenberg *et al.*, 2001; Schimitel *et al.*, 2012). De fato, estudos mostram que os comportamentos imobilidade tensa (*freezing*) e fuga (*flight*) podem ser obtidos mediante pequenas variações da intensidade de um estímulo elétrico aplicado por meio de um único eletrodo na MCPAdl ou MCPAl (Sudré *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2000; Schenberg *et al.*, 2001). Tal estimulação produz emoções aversivas (medo, agitação, ansiedade e sensação de morte iminente) em humanos e comportamentos defensivos em animais, uma proposição de modelo de AP (Nashold *et al.*, 1969; Gentil, 1988; Deakin e Graeff, 1991; Jenck *et al.*, 1995; Young e Rinaldi, 1997; Schenberg *et al.*, 2001; Bittencourt *et al.*, 2004; Schenberg, 2010; Schimitel *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012). Ademais, a inibição dos comportamentos de defesa à estimulação da MCPA de animais previamente expostos ao estressor choque inescapável nas patas tem sugerido a capacidade do evento estressor em inibir o sistema motivacional, com implicações na incontrollabilidade do estresse (Quintino-dos-Santos *et al.*, 2013).

Em ratos, a estimulação da MCPD com estímulos de baixa magnitude, elétricos ou químicos, produz uma reação de congelamento caracterizada por uma imobilidade tensa acompanhada da exoftalmia (protrusão do globo ocular e abertura máxima das pálpebras), enquanto estímulos mais intensos dão origem a um

comportamento vigoroso de fuga, compreendendo galopes e saltos (Schenberg *et al.*, 1993; Bittencourt *et al.*, 2004). Mais importante, a resposta de galope induzida pela estimulação da MCPD do rato foi seletivamente atenuada por panicolíticos clinicamente eficazes, administrados em doses e regimes terapêuticos similares aos empregados na terapia do TP (Vargas e Schenberg, 2000; Schenberg *et al.*, 2001). Consequentemente, embora as respostas defensivas induzidas por estimulação da MCPD tenham sido indistintamente propostas como um modelo de AP (Gentil, 1988; Deakin and Graeff, 1991; Jenck *et al.*, 1995), as evidências farmacológicas sugerem que a resposta de galope seja o melhor representante desta síndrome (Schenberg *et al.*, 2001, 2005). Curiosamente, panicógenos não seletivos aumentam a secreção de ACTH, CORT e PRL, enquanto tais hormônios não são alterados nas respostas intensas de ativação emocional e exercício físico induzidos no AP experimental por estimulação da MCPD de ratos (Schenberg *et al.*, 2008).

Cohen e White (1951) mostraram que o AP pode ser provocado por hiperventilação a 5 % de CO₂ em humanos. Por outro lado, Pitts e McClure (1967) demonstraram que o AP deixava traços fisiológicos, já que poderia ser eliciado pela infusão endovenosa de lactato de sódio (0,5 M) em pacientes predispostos, mas não em voluntários normais. Estudos posteriores forneceram provas numerosas das propriedades panicogênicas do lactato de sódio e CO₂, bem como de outros agentes (Graeff *et al.*, 2005). Do ponto de vista fisiológico, um dos aspectos mais importantes do AP é a ausência de respostas dos hormônios do estresse ACTH, CORT, além de PRL tanto nos ataques espontâneos e situacionais quanto nos casos de indução por infusão de lactato de sódio ou inalação de CO₂ (Liebowitz *et al.*, 1985; Cameron *et al.*, 1987; Levin *et al.*, 1987; Woods *et al.*, 1987a, b; Hollander *et al.*, 1989; Kellner *et al.*, 1998). Otte e colaboradores (2002) relataram que a infusão de lactato de sódio em pacientes de pânico aumenta a secreção de PRL sem alteração dos níveis de ACTH. Adicionalmente, Donald Klein (1993) propôs que o TP está relacionado ao medo produzido pelo disparo falso de um sistema de sufocamento e argumenta que esta hipótese é consistente com a hipersensibilidade dos pacientes com TP à infusão endovenosa de lactato de sódio e à inalação de CO₂, dentre outros aspectos respiratórios. Todavia, não são poucos os agentes e modelos panicogênicos e que tem assegurado estudo pormenorizado do evento estressante do AP (Cohen e White, 1951; Woods *et al.*, 1987; Klein, 1993; Graeff *et al.*, 2005).

O AP, tanto induzido em certas circunstâncias da vida real quanto suscitado por lactato e CO₂, assinala o TP por uma disfunção das projeções inibitórias serotoninérgicas e opioidérgicas do NDR e da MCPVL à MCPD, desencadeando o repertório reacional típico do ataque (Graeff *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005, 2008; Schenberg, 2010; Schimittel *et al.*, 2012). Deakin e Graeff (1991) postularam que as respostas de defesa (congelamento e fuga coordenada ou esquiva), análogas às da ansiedade e evocadas por ameaças distais ou potenciais, são facilitadas por projeções serotoninérgicas do NDR ao CPF, amígdala e hipotálamo. Ainda, as projeções serotoninérgicas direcionadas à MCPA inibem as respostas intensas de defesa (galope e salto), similares ao AP evocado por ameaças proximais ou iminentes (Deakin e Graeff, 1991).

Ainda a respeito do AP, os episódios agudos de medo desses ataques, ou sensação similar, acontecem de forma recorrente e na ausência de qualquer ameaça identificável e é caracterizado por uma experiência súbita de intenso estresse, pensamentos catastróficos e ansiedade severa, apresentando, entre outros sinais e sintomas, taquicardia, alterações respiratórias, sensação de sufocamento, dor no tórax, tremores, desejo de fuga e sensação de morte iminente (Freedman *et al.*, 1985; Stein *et al.*, 1992; Goetz *et al.*, 1994).

Neste contexto, dados clínicos têm sugerido que os transtornos do estresse agudo ou pós-traumático predis põem os pacientes ao AP (Safadi e Bradwejn, 1995; Koenen *et al.*, 2003; Nixon e Bryant, 2003). De fato, a combinação de fatores genéticos, experiências estressantes e estresse por períodos prolongados determinam a resposta do indivíduo a situações novas de estresse e sua vulnerabilidade aos transtornos psiquiátricos, incluindo o TP (Charney e Manji, 2004).

Interessantemente, a hipótese serotoninérgica da patofisiologia do TP propõe que pacientes com pânico possuem deficiência da inibição serotoninérgica nos neurônios localizados na MCPD, estrutura organizadora das reações defensivas para lidar com eventos ameaçadores (Graeff, 2012). O estresse de isolamento social em ratos adultos por seis semanas tem suscitado, à estimulação elétrica de baixa intensidade da MCPD semanalmente apresentada, redução dos limiares para as respostas defensivas exoftalmia, imobilidade e galope em comparação aos animais agrupados, o que parece ser explicado como comportamentos sensíveis à interação social na vida adulta e

facilitados pelo estresse crônico apresentado (Silva *et al.*, 2012). Interessantemente, segundo Rosa (2012), não houve efeitos diferenciados sobre o metabolismo serotoninérgico da MCPA em ratos expostos ao estresse de isolamento social neonatal (ISN). Todavia, enquanto foi observada a maior concentração de 5-HT na MCPD de ratos expostos ao estressor choque escapável (CE), os animais expostos ao estressor choque inescapável (CI) apresentaram maior concentração do neurotransmissor na MCPVL (Rosa, 2012).

Deakin e Graeff (1991) propuseram funções inibitórias e excitatórias da 5-HT nos mecanismos de defesa processados em estruturas mesencefálica (MCPD) e prosencefálicas (CPF e amígdala basolateral), respectivamente (Figura 4). Segundo esses autores, o TAG está relacionado a uma elevação da neurotransmissão serotoninérgica na circuitaria que inclui o núcleo mediano da rafe (NMnR) e amígdala, mediada por receptores 5-HT₂ pós-sinápticos, enquanto a redução da neurotransmissão, na via NDR e MCPA, está associada ao TP. Portanto, a teoria de Deakin e Graeff (1991) considera as diferenças anatômicas e funcionais das diferentes vias serotoninérgicas e os distintos tipos de receptores envolvidos. Interessantemente, as projeções do NDR a receptores 5-HT₂ e talvez 5-HT₃ na amígdala estariam associadas à modulação de respostas frente a eventos agudos aversivos, facilitando a esquiva, a ansiedade e o medo condicionado (Deakin e Graeff, 1991). Deakin e Graeff (1991) propõem também que os eferentes serotoninérgicos do NMnR para o hipocampo constituem um substrato de um “sistema comportamental de resiliência” capaz de separar os afazeres do dia-a-dia dos eventos aversivos, permitindo a adaptação às situações de estresse. Pela hipótese, a elevação dos níveis de CORT durante o estresse prolongado há subregulação dos receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, o que faz falhar o “sistema de resiliência” e desencadear a depressão (Deakin e Graeff, 1991).

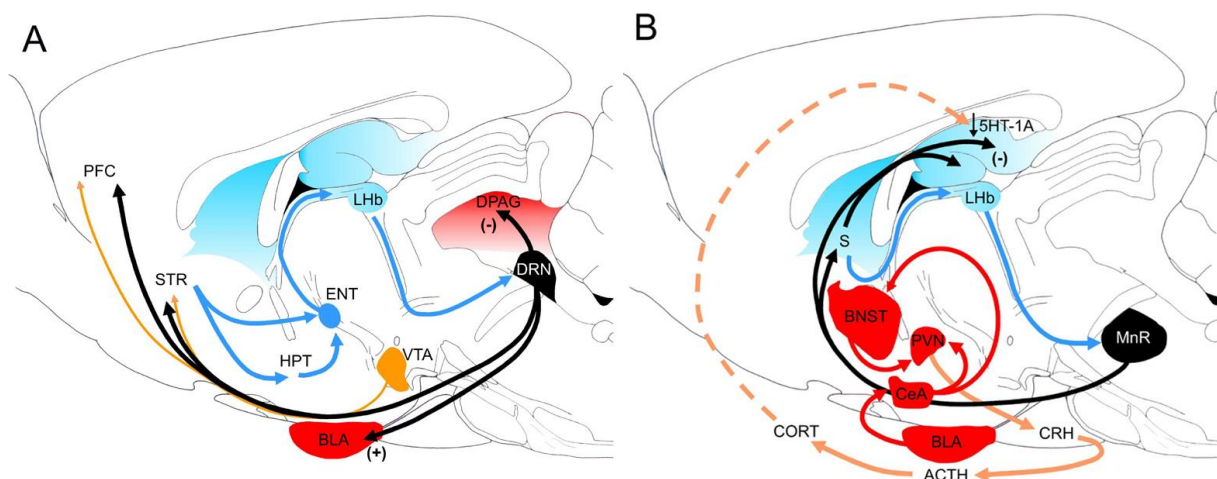


Figura 4 - Modelo da hipótese de Deakin e Graeff (1991) no cérebro de rato: A, Deakin e Graeff (1991) sugeriram que enquanto o transtorno da ansiedade generalizada é produzido pela hiperatividade das projeções excitatórias serotoninérgicas (5-HT) provenientes do núcleo dorsal da rafe (DRN) (setas pretas) para áreas do córtex pré-frontal (PFC) e amígdala basolateral (BLA), as quais processam a ameaça distal, o ataque de pânico é uma disfunção das projeções inibitórias de 5-HT na matéria cinzenta periaquedutal dorsal (DPAG), desse modo liberando a resposta a ameaças proximais, medo inato ou anóxia. O conflito da ansiedade é o resultado da atividade simultânea das projeções de 5-HT do DRN e das projeções dopaminérgicas provenientes da área tegmentar ventral (VTA), que se projetam para o estriado (STR), e medeiam os comportamentos de esquiva e aproximação, respectivamente. B, Deakin e Graeff (1991) também propuseram que as eferências 5-HT que se projetam do núcleo mediano da rafe (MnR) ao hipocampo, sejam o substrato do "sistema de resiliência comportamental", responsável pelo equilíbrio dos eventos estressantes diários. Os níveis aumentados de glicocorticóides (CORT) dessensibilizaria os receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, levando ao surgimento do desamparo aprendido e depressão. Note a localização central da habênula lateral (Lhb) na regulação das atividades do DRN e do MnR. BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo do leito da estria terminal; CeA, amígdala central; CRH, hormônio liberador de corticotrofinas; HPT, hipotálamo; ENT, núcleo entopeduncular (pálido interno); PVN, núcleo paraventricular do hipotálamo; S, septum. Adaptado de Schenberg (2010).

Em estreito paralelismo com as projeções noradrenérgicas e dopaminérgicas, as projeções serotoninérgicas dorsal e ventral seguem vias ascendentes distintas (Lucinda, 2006). Assim, a via dorsal, oriunda principalmente do NDR, se distribui para a MCPA, colículos (superior e inferior) e hipotálamo, ponto de convergência com a via ventral, oriunda preponderantemente do NMnR, que percorre o tegmento ventral, transpassa o feixe prosencefálico medial e se projeta no hipotálamo posterior e corpos mamilares (Lucinda, 2006). As duas vias serotoninérgicas, agora reunidas, projetam-se para a amígdala e neocórtex (Lucinda, 2006).

Interessantemente, estudos de tomografia por emissão positrônica (PET) revelaram que o polo frontal do lobo temporal, a ínsula, o cerebelo e o teto do mesencéfalo, compreendendo as camadas profundas do colículo superior e a MCPD, foram as únicas estruturas ativadas no AP induzido por infusão endovenosa de lactato (Reiman *et al.* 1989). Estudo *in vivo* de PET mostraram uma redução da ligação específica para receptores 5-HT_{1A} tanto no NMnR quanto nas regiões anterior e posterior do giro cingulado de pacientes com TP (Neumeister *et al.*, 2004). Por conseguinte, estas anormalidades podem resultar em alterações funcionais dos neurônios controladores dos comportamentos defensivos, uma vez que a projeções serotoninérgicas do NDR atingem a MCPD (Neumeister *et al.*, 2004).

Ainda, dos núcleos da rafe, o maior número de neurônios serotoninérgicos é encontrado no NMnR (Törk e Hornung, 1990; Adell *et al.*, 2002). Tais núcleos constituem a principal fonte de projeções serotoninérgicas ascendentes (Bobillier *et al.*, 1975; Kosofsky and Molliver, 1987; Haring, 1991). Assim, a função da 5-HT na ansiedade é dependente da estrutura cerebral, do tipo de receptores e do tipo de ansiedade. Segundo o modelo teórico desenvolvido por Wise e colaboradores (1972), a 5-HT inibiria o comportamento punido através da estimulação das estruturas periventriculares e MCPA, induzindo efeitos ansiogênicos. Adicionalmente, pacientes com TP comórbida à depressão apresentam AP, evento de estresse inquestionável, mais severos e um risco maior de suicídio (Jonhson e Lyard, 1998; Lecrubier, 1998; Kaufman e Charney, 2000).

Neste contexto, a análise separada das respostas condicionadas (associadas ao TAG) e incondicionadas (associadas ao TP) de medo, em aparato modificado do LCE, mostra que enquanto a 5-HT inibe as respostas de fuga do braço aberto inseguro ao braço fechado do labirinto em T elevado (LTE) (comportamento panicogênico), o neurotransmissor aumenta o tempo de permanência dos animais no braço fechado seguro (comportamento ansiogênico) (Graeff *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994). Tais experimentos corroboraram a participação da MCPA na mediação do TP (Zanoveli *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011; Roncon *et al.*, 2012). Mais especificamente, enquanto os receptores 5-HT₂ da MCPD medeiam os efeitos excitatório da esquila inibitória (5-HT_{2C}) e inibitório da fuga do braço aberto (5-HT_{2A}), os receptores 5-HT_{1A} estão preferencialmente envolvidos na regulação da última resposta (Pobbe e Zangrossi, 2005). Além dos efeitos das drogas serotoninérgicas na MCPD, os estudos no LTE

mostraram que a estimulação de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} da MCPVL causa efeitos do tipo ansiolítico, prejudicando a aquisição da esquiva inibitória sem alteração do comportamento de fuga (Soares e Zangrossi, 2009).

Dado o exposto, parece razoável compreender a MCPA como um elemento importante na proteção e regulação homeostática do organismo, o que inclui também a ação da 5-HT em sua complexidade funcional, voltada a direcionar mecanismos adaptativos ou promover enfrentamento das situações estressantes.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do modelo de ECMI sobre o metabolismo da 5-HT na MCPA, sobre os níveis plasmáticos de CORT e sobre os comportamentos dos tipos ansioso e depressivo em ratos adultos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os níveis plasmáticos de CORT e os níveis tissulares de 5-HT, de 5-HIAA e da TR-5HT na MCPD e na MCPVL em ratos adultos submetidos ao modelo de ECMI.
2. Avaliar os efeitos do modelo de ECMI sobre os comportamentos dos tipos ansioso e depressivo em ratos adultos.

ESTUDO I:

EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL SOBRE O METABOLISMO DA SEROTONINA NA MATÉRIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL E SOBRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA EM RATOS ADULTOS

RESUMO

Dados clínicos e epidemiológicos sugerem que a incontrolabilidade do estresse crônico facilita o desenvolvimento da depressão. Ademais, o impacto do estresse depende do tipo do estressor, das condições do indivíduo afetado e da sua responsividade ao evento estressante, incluindo o perfil de respostas de hormônios do estresse, como o cortisol ou corticosterona (CORT). Por outro lado, evidências sugerem que a serotonina (5-HT) esteja profundamente envolvida nos transtornos de ansiedade e depressão, atuando inclusive em mecanismos de defesa, dada sua função inibitória sobre a porção dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). São abordados os efeitos do estresse crônico moderado imprevisível (ECMI) sobre os níveis tissulares de 5-HT e de seu principal metabólito, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), bem como sobre a taxa de renovação serotoninérgica (TR-5HT) nas regiões dorsal (MCPD) e ventrolateral (MCPAVL) da MCPA de ratos adultos (n = 16, grupo ECMI; n = 14, grupo Controle), incluindo os níveis de CORT em resposta ao estresse. O ECMI, por 9 dias (PN70-PN78), foi feito com exposições intermitentes e variadas de estressores moderados, seguido de dosagem plasmática de CORT e dos níveis de 5-HT e 5-HIAA na MCPA. As alterações serotoninérgicas acompanharam de elevações dos níveis plasmáticos de CORT nos animais estressados, ainda que sem significância estatística. O grupo ECMI apresentou aumentos significativos nos níveis de 5-HT na MCPD e elevações marginais na MCPVL em relação ao grupo Controle. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de 5-HIAA na MCPA entre os grupos experimentais. Houve redução estatisticamente significativa na TR-5HT na MCPVL do grupo ECMI em relação ao grupo Controle e redução também na MCPD, ainda que sem significância estatística. Estes resultados mostram os efeitos diferenciados do ECMI sobre o metabolismo serotoninérgico na MCPA e parecem sugerir o envolvimento da 5-HT na inibição da MCPD para controle do evento estressante.

INTRODUÇÃO

O estresse consiste em uma reação inespecífica e estereotipada do organismo às demandas externa e interna do corpo, segundo Hans Selye (Selye, 1936; Selye e Fortier, 1949). De fato, a homeostase é constantemente desafiada por forças adversas, sendo o estressor o estímulo e o estresse a condição provocada pelo desafio (Selye, 1973). Todavia, respostas simpáticas e neuroendócrinas, com as variações de intensidades dos estressores, pressupõem que cada estressor possui um perfil neuroendócrino próprio (Mason, 1971; Pacak *et al.*, 1998; Anisman e Merali, 1999; Paykel, 2001).

O estresse é caracterizado por aumento da síntese de CRH, secreções de ACTH e liberação de CORT (Guyton e Hall, 2006; Ulrich-Lai e Herman, 2009). De fato, as atividades do eixo HHA e do sistema nervoso simpático se mostram pronunciadas, incluindo a liberação de PRL, no estresse agudo em humanos e em animais (Neill, 1970; Krulich *et al.*, 1974, Siegel *et al.*, 1980; Mioduszewski *et al.*, 1982; Dijkstra *et al.*, 1992). Ainda, enquanto os MR operam em presença de concentrações reduzidas de CORT e exercem o controle basal do eixo HHA, os GR são ativados nas concentrações elevadas de CORT e desempenham um papel fundamental em situações de estresse (Reul *et al.*, 1989; McEwen 1991; De Kloet *et al.*, 1998; Buckingham, 2006; Chrousos, 2007; Einarsson *et al.*, 2008). Nesse sentido, animais submetidos a estresse crônico podem exibir respostas neuroendócrinas normais, ou até mesmo aumentadas a um novo estressor apresentado, dado o intenso *feedback* negativo pelos níveis elevados de glicocorticóides no prolongado estresse (Scribner *et al.*, 1991; Bhatnagar *et al.*, 1995).

Repercussões patológicas parecem estar mais associadas com o estresse crônico, em que há maior exigência dos mecanismos homeostáticos na hiperexposição do organismo aos agentes estressores (McEwen e Magarinos, 1997; Buckingham, 2006; Goldstein, 2010; Abelaira *et al.*, 2013). Adicionalmente, a incontrollabilidade no estresse crônico pode facilitar o desenvolvimento da depressão, inclusive com evidências epidemiológicas das respostas e sintomas do transtorno depressivo (Maier, 1984; Kendler *et al.*, 1999; Alfonso *et al.*, 2005; Henn e Vollmayr, 2005; Maier e Watkins, 2005, 2010; Czéh *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2006; Hammack *et al.*, 2012). De fato, em cerca de 60 % dos casos de depressão, os episódios depressivos são precedidos pela

ocorrência de fatores estressantes (Post, 1992). Além disso, a conhecida influência de fatores genéticos no desenvolvimento da depressão associa-se à sensibilidade a eventos estressantes, inclusive com hospitalização de pacientes deprimidos e com sérios prejuízos em suas atividades diárias após eventos estressantes (Kendler *et al.*, 1995; Guimarães, 2000).

Os efeitos do estresse têm sido estudados também em animais, como no protótipo de ECM com origem nas observações de Katz (1982), em que ratos apresentavam comportamentos anedônicos após estresse crônico (Katz, Schmaltz, 1980; Katz *et al.*, 1981). A versão original do paradigma foi modificada por Willner (1987) que buscou a exposição a estressores amenos, como a restrição de água e comida, alteração da temperatura ambiental ou iluminação contínua, o que induziu redução da preferência à solução de sacarose (Willner *et al.*, 1992; Willner, 1997; Willner e Papp, 1997; Willner, 2005). O paradigma de ECMI oferece condições de avaliar os impactos neurofisiológicos e comportamentais do estresse, incluindo estudos farmacológicos com agentes antidepressivos nos animais expostos ao ECM (Willner *et al.*, 1987; D'Áquila *et al.*, 1997; Manoli *et al.*, 2000; Gambarana *et al.*, 2003; Anisman e Matheson, 2005; Bekris *et al.*, 2005; Mitchell e Baker, 2010; Wright e Panksepp, 2011).

Em especial atenção, o sistema serotoninérgico também tem sido estudado em variadas situações de estresse nos animais, sendo a atividade serotoninérgica, nas mais distintas regiões encefálicas, um importante indicativo de controle dos estados aversivos e grau de responsividade ao evento estressante apresentado (Newsholme, 1987; Blomstrand *et al.*, 1989; Deakin e Graeff, 1991; Bailey *et al.*, 1993; Soares *et al.*, 2003, 2004, 2007; Rosa, 2012). Por exemplo, níveis reduzidos cerebrais de 5-HT foram encontrados em ratos submetidos ao estresse crônico leve e variado (Gamaro *et al.*, 2003). Ainda, é hipotetizada que a elevação de glicocorticóides no estresse crônico pode elicitar a subregulação de receptores 5-HT_{1A} no hipocampo, gerando um lapso na resiliência e podendo desencadear um estado depressivo (Deakin e Graeff, 1991). Estudos *in vitro* e *in vivo* revelam prejuízos do estresse sobre o sistema serotoninérgico, em que os glicocorticóides, liberados em resposta ao estresse, diminuem a expressão de receptores 5HT_{1A} pós-sinápticos no hipocampo e no córtex cerebral, estruturas envolvidas nos estados de depressão e ansiedade (Meijer *et al.*, 1997; Carrasco e Van de Kar, 2003).

Por outro lado, atendo-se à relação da 5-HT com a MCPA, a estrutura mesencefálica de aparência indiferenciada e de relativa estabilidade evolutiva está envolvida em funções importantes de proteção, regulação homeostática e participação na expressão dos estados emocionais (Carrive, 1993). Ademais, a relação da 5-HT com a MCPA tem sido considerada na hipótese de Deakin e Graeff (1991), em que propuseram funções inibitórias e excitatórias desse neurotransmissor nos mecanismos de defesa processados na MCPD e em estruturas prosencefálicas (CPF e amígdala basolateral), respectivamente. Segundo Deakin e Graeff (1991), o TAG está relacionado a uma elevação da neurotransmissão serotonérgica na circuitaria que inclui o NMnR e amígdala, mediada por receptores 5-HT₂ pós-sinápticos, enquanto a redução da neurotransmissão, na via NDR e MCPA, está associada ao TP (Deakin e Graeff, 1991).

Interessantemente, as projeções do NDR a amígdala, envolvendo receptores 5-HT₂ e talvez 5-HT₃, na amígdala estariam associadas à modulação de respostas frente a eventos agudos aversivos, facilitando a esquiva, a ansiedade e o medo condicionado (Deakin e Graeff, 1991). Os autores propõem também que os eferentes serotonérgicos do NMnR para o hipocampo constituem substrato de um “sistema comportamental de resiliência” capaz de separar os afazeres diários dos eventos aversivos, permitindo a adaptação às situações de estresse (Deakin e Graeff, 1991). Pela hipótese, a elevação dos níveis de CORT durante o estresse prolongado subregula os receptores 5-HT_{1A} do hipocampo, o que faz falhar o “sistema de resiliência” e desencadear a depressão (Deakin e Graeff, 1991).

Portanto, o sistema serotonérgico, tão complexo e diverso quanto suas sete classes de receptores (5-HT₁₋₇), pode produzir diferentes efeitos neurofisiológicos, circunstâncias consideráveis para a caracterização do controle dos estados aversivos ou estressantes pela 5-HT, na MCPA, particularmente em um modelo de ECMI, propósito deste estudo. Hipotetiza-se níveis alterados do neurotransmissor 5-HT na MCPA de animais expostos ao ECMI em relação aos controles. Para tanto, objetiva-se neste estudo a avaliação do metabolismo serotonérgico na MCPD e MCPVL desses animais, além da mensuração dos níveis plasmáticos de corticosterona.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos, espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar (n = 30), após período de amamentação de 21 dias (21º dia pós-natal ou PN21) e pesando entre 90-100 g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais dos grupos experimentais foram mantidos agrupados em gaiolas-casa de polipropileno (60 cm x 50 cm x 22 cm) com assoalho coberto por serragem, na Sala de Estresse, até o início da ativação dos estressores, quando o grupo Controle foi realocado para a Sala Sem Estresse. Os animais pesavam entre 300-400 g ao início dos experimentos (PN70).

Foram assegurados registros de temperatura, intensidades luminosa e sonora e umidade nas duas salas experimentais. Assegurou-se também a higienização das gaiolas-casa e fluxo de ar por exaustor, além da oferta de ração padronizada e água *ad libitum*, salvo quando não convenientes ao propósito experimental. O monitoramento do ambiente dos animais foi sustentado desde o Biotério.

Foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, concea.mct.gov.br), que estão em conformidade com as normas internacionais de pesquisas científicas envolvendo animais. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do CCS/UFES, nº 066/2012. Os procedimentos foram conduzidos com minimização de dor e menor desconforto possível.

Procedimentos

Paradigma de estresse crônico moderado imprevisível

Buscou-se a construção modificada do modelo de estresse crônico proposto inicialmente por Katz e colaboradores (Katz e Schmaltz, 1980; Katz *et al.*, 1981) e posteriormente alterado por Wilner (1997). Todavia, para o propósito do estudo, foi definida uma apresentação imprevisível de distintas combinações de estressores de intensidade moderada, adaptações exploradas em outros trabalhos (Forbes *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 2000; Pacák e Palkovits, 2001) e condições disponíveis em nosso

laboratório. Os animais foram alocados aleatoriamente nos grupos ECMI (n = 16) e Controle (n = 14) e foram individualmente identificados (Figura 5).



Figura 5 - Cronograma experimental com os eventos subsequentes entre os grupos Controle e ECMI a partir da sexagem (PN1). ECMI, estresse crônico moderado imprevisível; CORT, corticosterona; 5-HT, serotonina; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético.

Para o ECMI, buscou-se reunir estressores moderados conhecidos (Willner *et al.*, 1992; Pucilowski *et al.*, 1993). Os ratos do grupo ECMI foram por 9 dias expostos aos estressores: agitação intermitente, ambiente frio, alta umidade, luz contínua, luz estroboscópica, ruído, assoalho descoberto (sem maravalha), gaiola-casa suja e molhada, bebedouro vazio e restrição alimentar (Figura 6).

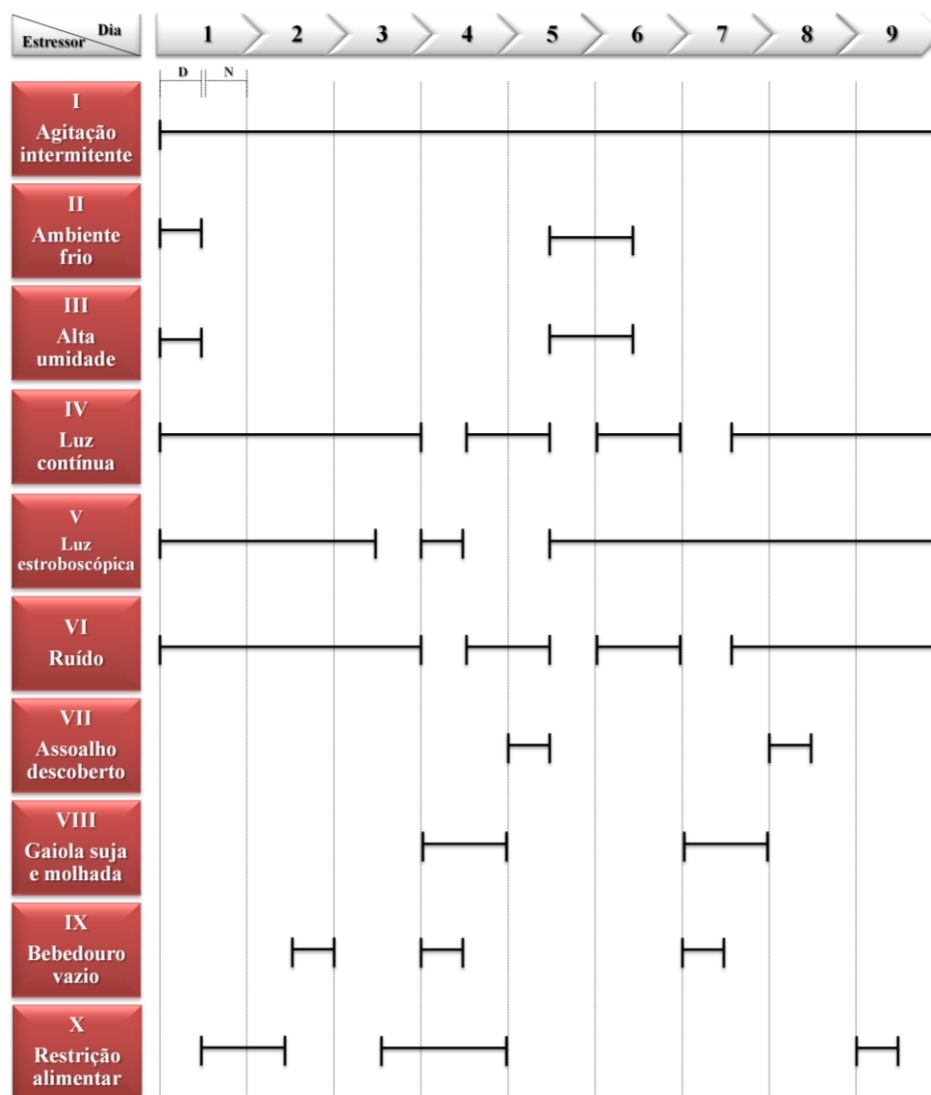


Figura 6 - Protocolo de estresse crônico moderado imprevisível (ECMI). As linhas contínuas horizontais (—) demarcam os períodos de ativação dos estressores. As linhas verticais (|) separam cada um dos 9 dias de estresse, subdivididos em períodos diurno (D) e noturno (N).

Por outro lado, os animais do grupo Controle foram alojados na Sala Sem Estresse, sob condições controladas de iluminação (luz acesa das 6 h às 18 h; 58 lx de intensidade luminosa), umidade (inferior a 60 %), temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ruído (46 dB, majoritariamente do sistema de condicionamento e exaustão de ar).

Os animais do grupo ECMI tiveram suas gaiolas-casa apoiadas sobre plataformas vibráteis e osciláveis (modificações do Agitador Multifuncional de Kline, tipo VDRL, modelo TS-2000A, frequência de 40 a 240 rpm, 15 mm de raio de agitação, dimensões externas 270 x 350 x 170 mm, 35 W) por 15 min ininterruptos em cada 5 episódios diários não consecutivos e de distribuição aleatória nos períodos diurno (entre

6 h e 18 h) e noturno (entre 18 h e 20 h) (Figura 6). Para tanto, foram utilizados 4 agitadores programados distintamente por temporizadores (Timer Analógico Kienzle Eco-100S), enquanto as gaiolas-casa eram diariamente alternadas entre as plataformas. Foi garantida a intensidade moderada desse estressor, o que correspondeu a 64,4 % da velocidade máxima de agitação (3º nível dos 7 níveis crescentes de velocidade) (Figura 7).

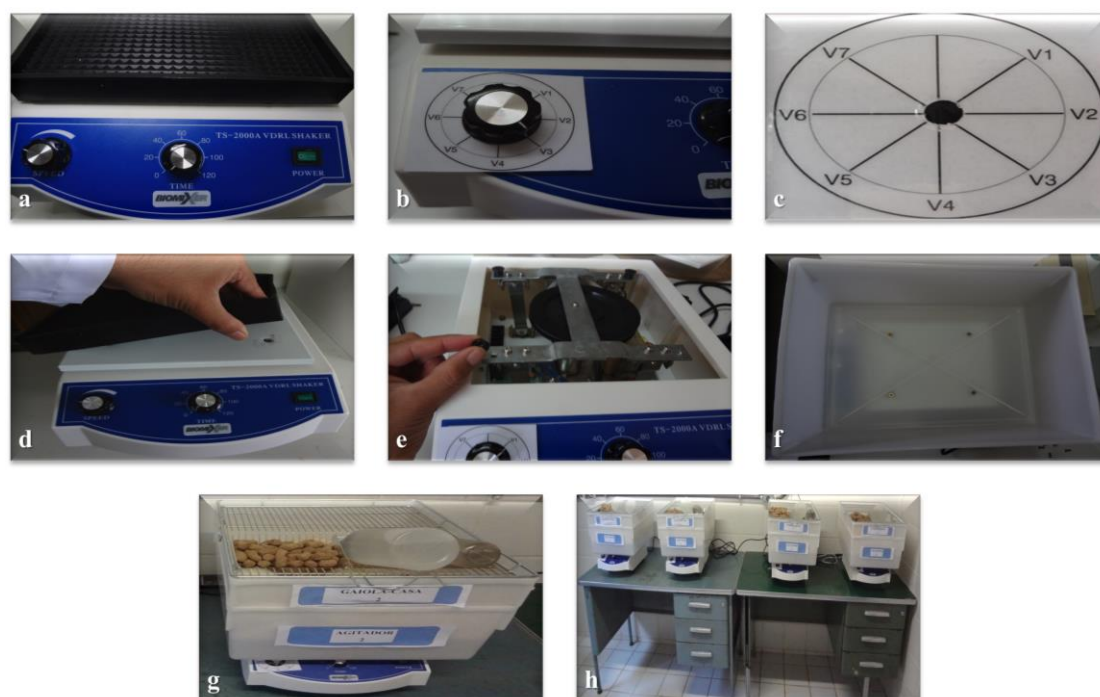


Figura 7 - Confeção do estressor agitador. a-f, etapas consecutivas de montagem das plataformas vibráteis para as gaiolas-casa. g, gaiola-casa posicionada sobre a plataforma. h, gaiolas-casa alternadas diariamente entre os agitadores, da esquerda para a direita (dois ciclos ao longo dos 9 dias de protocolo).

A alternância entre as plataformas também permitiu uma maior e menor aproximação dos animais das fontes do ruído (alarme), das iluminações (luz contínua e estroboscópica) e do ar frio eventual (ar condicionado) (Figura 8).

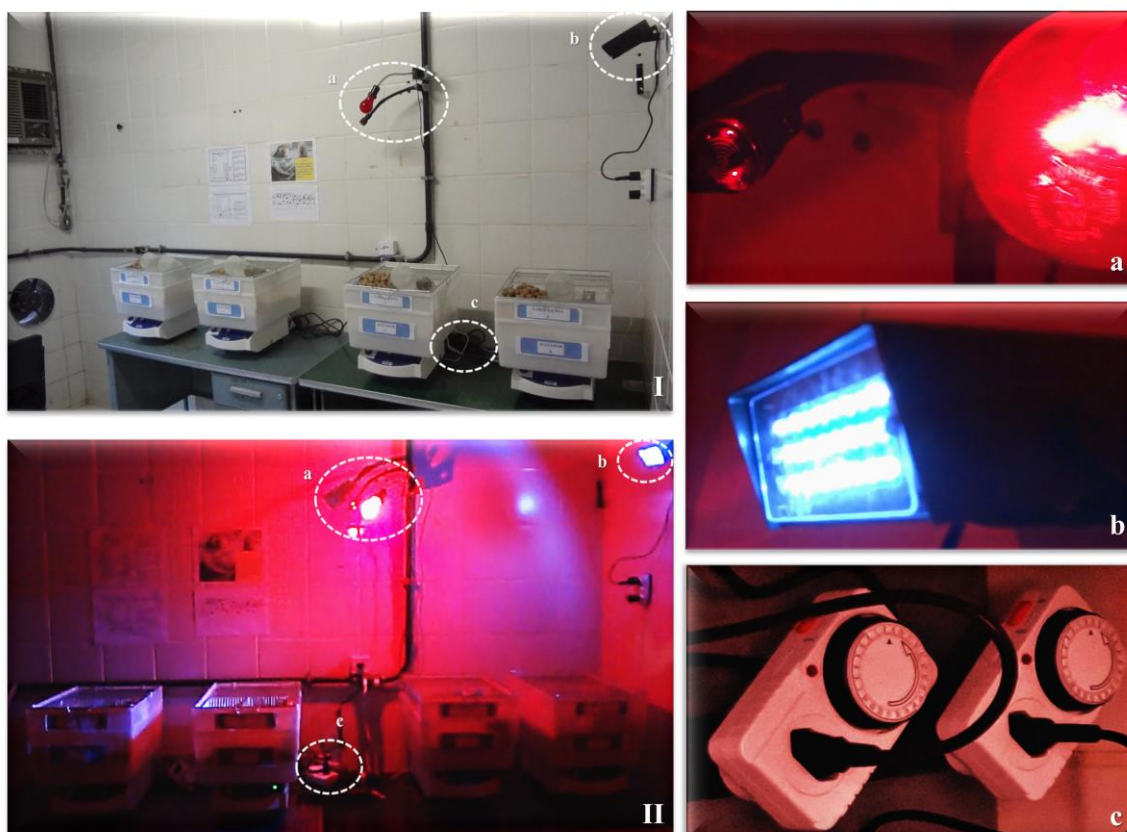


Figura 8 - Sala de Estresse nos períodos diurno (I) e noturno (II). Em destaque, os estressores: a, iluminação contínua (de cor vermelha) e fonte do ruído; b, iluminação estroboscópica (de cor branca); c, temporizadores com programações distintas para cada agitador.

Os estressores ruído (alarme sonoro, indicator light HD16-22D/S), iluminações incandescente (lâmpada vermelha, bulbo A-55, 40W, Sylvania) e estroboscópica (lâmpada estrobo, Discoflash-Lamp, 1 flash de luz/s, 6W, branca, 10,3 cm X 5,7 cm X 16 cm) foram também acionados de modo intermitente nos períodos protocolados, assim como o estressor ambiente frio (Figura 6).

O monitoramento ambiental durante o protocolo ECMI registrou alterações na iluminação (de até 144 lx) (luxímetro LX-1010B), no ruído (de 64 dB para até 85 dB) (decibelímetro Impac IP-410), na temperatura (de 23 °C para 18 °C) e na umidade (de 62 % para 77 %) (Termo-Higrômetro Digital, Minipa MT-242) (Figura 9).

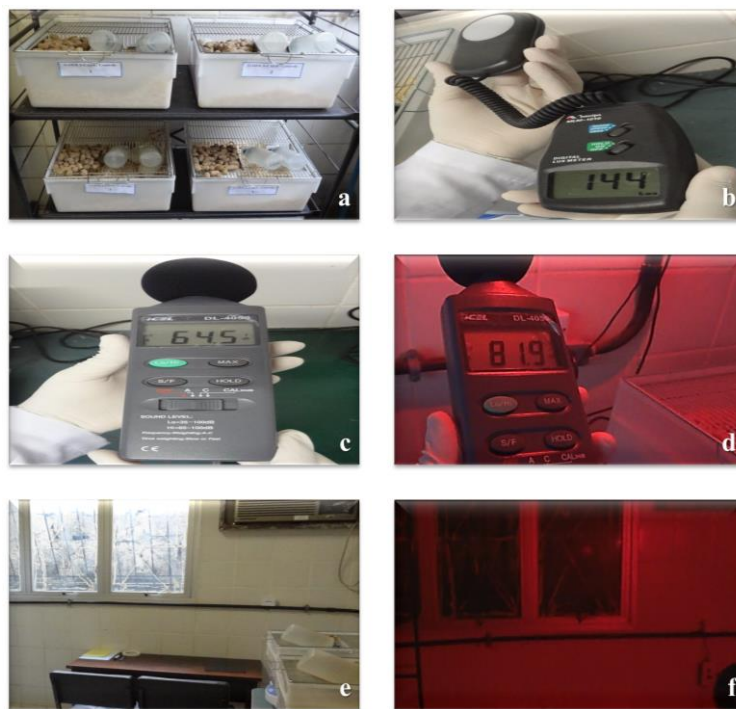


Figura 9 - Monitoramento dos estímulos estressores. a, ambiente plácido do grupo Controle. b, iluminação ambiental de até 144 lx. c, 64 dB de ruído de fundo (majoritariamente do sistema de condicionamento e exaustão de ar). d, registro superior a 80 dB (não além de 85 dB) durante a ativação do estressor ruído. e, janela ampla para incidência de luz solar. f, iluminação incandescente noturna.

As gaiolas-casa foram mantidas sujas e molhadas no 4º e 7º dia do ECMI, de modo que aproximadamente 700 mL de água dos bebedouros molhavam a maravalha com o agitar das plataformas, período de exposição do estressor bebedouro vazio. Por fim, a restrição alimentar foi completa nos períodos noturnos do 1º e 3º dia de ECMI e moderada (metade da oferta convencional) no 2º, 4º e 9º dia do protocolo (Figura 6).

Assim, buscou-se abranger os sentidos tato, visão, audição, olfato e paladar no modelo experimental.

Coleta das amostras de tecido da MCPA

Em P79, pela manhã, os animais foram eutanasiados por decapitação (guilhotina, Insight EB271, Ribeirão Preto, Brasil) e seus cérebros foram imediatamente removidos para a microdissecção da MCPA pela técnica de *punch* (picoteamento). Para

tanto, os cérebros foram ajustados em um suporte de corte cerebral para realização de 3 a 4 secções coronais de aproximadamente 1 mm de espessura até o limite aproximado de 8,3 mm posteriores ao Bregma (Paxinos e Watson, 2005) (Figura 10).

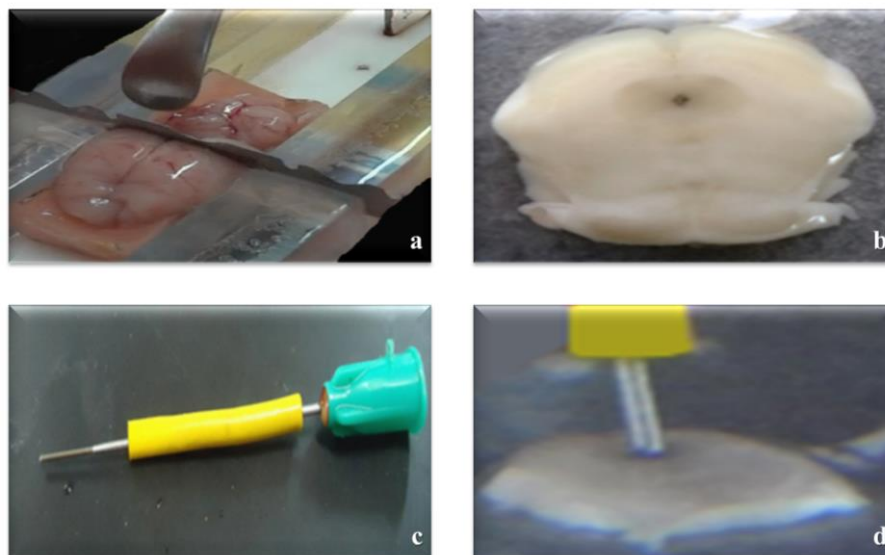


Figura 10 – Microdissecção da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) pela técnica de *punch* (picoteamento). a, suporte para secções cerebrais. b, secção com MCPA ao centro (região cinzenta ao redor do aqueduto), umedecida com líquido artificial. c, perfurador de aço inoxidável para a microdissecção (d).

As secções cerebrais foram estendidas em papel de filtro (papel filtro, faixa branca, C40, diâmetro de 125 mm), sobreposto a uma placa de Petri (placa de Petri de vidro, fundo plano, 100 x 20 mm), resfriada em gelo subjacente. Ainda, uma lâmina de plástico preto foi posicionada entre o papel e a placa, o que aumentou o contraste das estruturas cerebrais nas secções umedecidas com líquido cérebro-espinhal artificial (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 4 mM, Glicose 25 mM e TRIS 20 mM).

As áreas identificadas como MCPD e MCPVL foram totalmente removidas com o auxílio de uma lupa e um perfurador de aço inoxidável, construído a partir de um segmento de cateter intravenoso periférico (Embramac, 14 G, Itajaí, Brasil), com diâmetros externo e interno de 2,1 e 0,6 mm, respectivamente (Figuras 10 e 11). A parede da extremidade do perfurador foi afiada e polida para 0,2 mm de espessura para picotear (*to punch out*) a MCPA sem perda significativa de tecido. Em seguida, utilizava-se o mandril do próprio cateter para extração do tecido do interior da agulha (Figura 10).

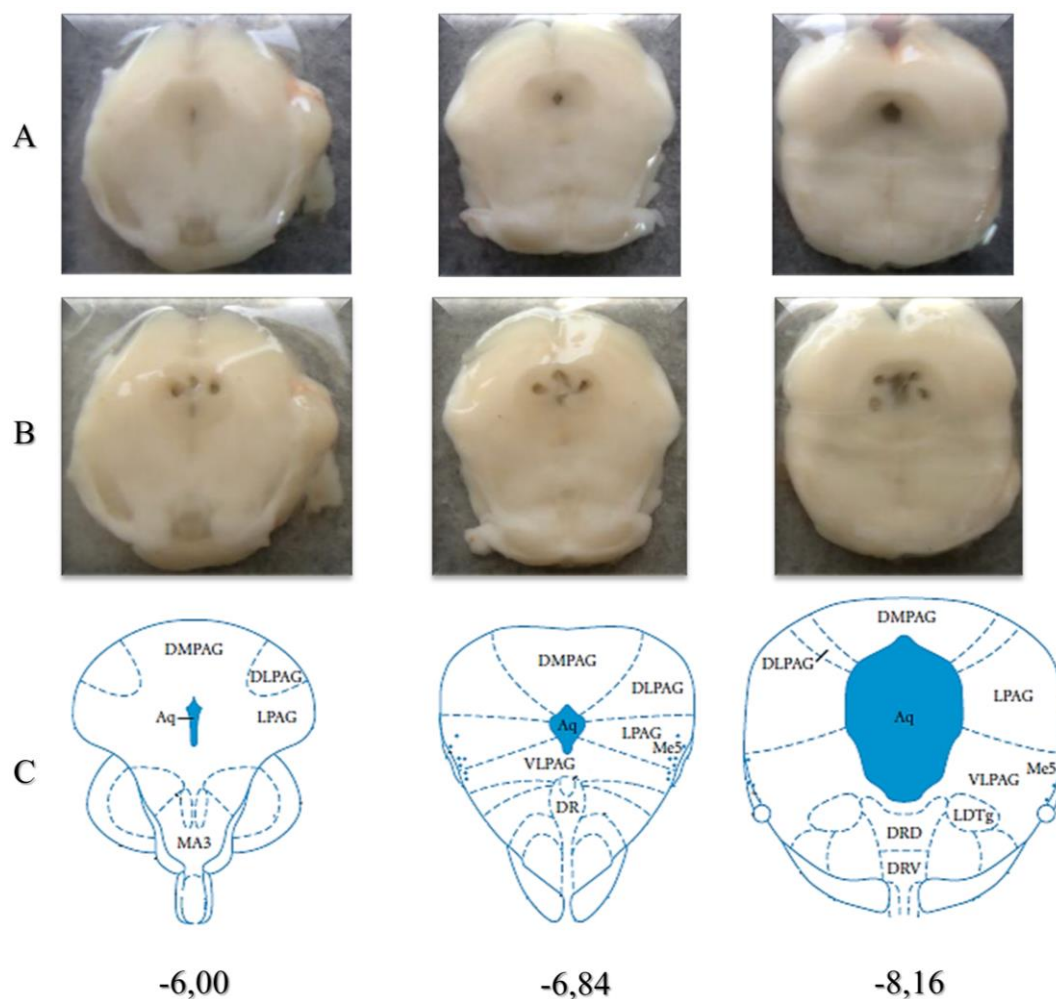


Figura 11 - Secções da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). A, secções coronais de 1 mm da MCPA até o limite aproximado de 8,3 mm posterior ao Bregma. B, secções após a microdissecção da MCPA (dorsal e ventral). C, organização colunar e radial da MCPA. Aq, aqueduto; DLPAG, coluna dorsolateral medial da MCPA; DMPAG, coluna dorsomedial da MCPA; DR, núcleo dorsal da rafe; DRD, componente dorsal do DR; DRV, componente ventral do DR; LDTg, núcleo laterodorsal tegmental; LPAG, coluna lateral da MCPA; MA3, núcleo oculomotor medial acessório; Me5, núcleo mesencefálico do trigêmeo; VLPAG, coluna ventrolateral da MCPA (Paxinos e Watson, 2005). Fotografias modificadas de Rosa (2012).

Análise dos níveis tissulares de 5-HT, 5-HIAA e da TR-5HT da MCPA

Após 30 dias de armazenamento das amostras a -80°C (ultrafreezer vertical, Waiser Scientific, CL 374-80, São Paulo, Brasil), 5 mg do tecido foram homogeneizados em tubo Potter-Elvehjem com 290 μL de HClO_4 0,1 M, 5 μL de EDTA 0,1 mM e 5 μL de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 0,4 mM (Apêndice A). Em seguida, o tecido homogeneizado foi centrifugado a 4°C , a 7267 G por 30 min (centrífuga refrigerada Eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemanha). Os sobrenadantes das amostras foram separados individualmente, mantidos resfriados em gelo e imediatamente analisados por

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O precipitado das amostras foi separado para dosagem espectrofotométrica de proteínas.

A CLAE em fase reversa foi realizada em uma coluna analítica C18 (4,6 x 250 mm, partículas de 5 μ m; ZORBAX Eclipse XDB-C18, Agilent, Santa Clara, CA, USA), com um módulo de propulsão de solvente LC-20AT, um forno de coluna CTO-20A ajustado a 28 °C, um módulo degaseificador DGU-20A5 e um módulo controlador de sistema CBM-20A, adquiridos da Shimadzu (Prominence UFLC, Quioto, Japão). Um detector eletroquímico pulsátil com eletrodo de carbono vítreo (DECADE II SCC, Antec, Zoeterwoude, Holanda) foi ajustado a 0,85 V (Apêndice D).

A fase móvel consistiu de ácido cítrico monoidratado 0,194 M, acetato de sódio triidratado 0,243 M, EDTA $2,95 \times 10^{-4}$ M e 45 mL de metanol, para um volume final de 500 mL, ajustado para pH 4,0 e bombeada em modo isocrático a 1 mL/min (Apêndice B). 100 μ L da amostra foram injetados (injetor de amostra Rheodyne 7755-024, IDEX Health & Science LLC, Rohnert Park, CA, USA). O *software* LCsolution v.1.25 (Shimadzu, Quioto, Japão) foi usado no processamento dos dados cromatográficos.

As soluções padrão de 5-HT e de 5-HIAA (Sigma-Aldrich, ≥ 98 % de pureza, Saint Louis, MO, EUA) foram preparadas e analisadas concomitantemente (Apêndice C), mas foi precedida uma averiguação individualizada dos seus tempos de retenção. As concentrações teciduais de 5-HT e 5-HIAA foram calculadas por interpolação das suas respectivas curvas de calibração (Apêndices E-H). 5-HT e 5-HIAA eluíram, em média, em 4,1 e 8,2 min, respectivamente (Apêndice I). Os valores obtidos foram expressos em ng/g de proteína. A razão [5-HIAA]/[5-HT] (TR-5HT) foi usada como um índice de atividade do sistema serotoninérgico (*turnover*).

Dosagem de proteínas

O precipitado das amostras processadas foi conduzido para análise espectrofotométrica (espectrofotômetro Evolution[®] 300 UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) de proteínas, com o auxílio do *software* VISIONpro[®] v.4.20 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). A concentração proteica foi estimada pela absorção a 205 nm, utilizando a equação *Concentração de proteínas (mg/mL) = (F x*

$A_{205}D_f$; $Fator_{205} = 31$ (1 mg/mL equivalente a 31 unidades de absorbância) (Scopes, 1974).

Coleta de Sangue e dosagem hormonal

Em PN79, pela manhã, as amostras de sangue do tronco foram coletadas imediatamente após a eutanásia. A fim de se evitar viés experimental, garantiu-se a higienização do ambiente a cada sessão, a não reutilização de materiais descartáveis e a amenização de ruídos.

O sangue foi coletado em tubos contendo 0,5 mL de EDTA (1:50000) e centrifugado a 4 °C, a 290,68 G, por 10 min (Eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemanha). Após o registro do volume final de plasma de cada amostra para a correção do volume adicionado de EDTA, o plasma era armazenado em tubos eppendorf, conservado a -20 °C (refrigerador Consul duplex, CRD48, São Paulo, Brasil) até ser transportado, em gelo seco, para o Centro de Desenvolvimento em Estudos Clínicos (CDEC) da Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP, São Paulo, Brasil), para dosagem de CORT. Utilizou-se o kit de radioimunoensaio Immuchem[®] Double Antibody Corticosterone 125I RIA kit (MP Biomedicals, Orangeburg, NY, USA). As concentrações de CORT foram calculadas por interpolação da curva de calibração e expressas em ng/mL.

Análise estatística

Os dados bioquímicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de um fator e as diferenças foram testadas utilizando o teste *post hoc* de Bonferroni. Os níveis de CORT foram analisados pelo teste t de Student não pareado. Todos os valores foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) e foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. O software Graph Pad Prism v.5.01 (La Jolla, CA, USA) foi utilizado para análise estatística e representação gráfica.

RESULTADOS

Efeitos do ECMI sobre os níveis de 5-HT, 5-HIAA e na TR-5HT na MCPA

A ANOVA de um fator detectou diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de 5-HT ($F_{3,50} = 16,65$; $p < 0,0001$). O grupo ECMI ($1001,41 \pm 91,82$ ng/g; $n = 15$) apresentou maior nível de 5-HT na MCPD em relação aos níveis dorsais do grupo Controle ($598,94 \pm 88,31$ ng/g; $n = 14$), com diferença estatisticamente significativa ($t = 3,714$; $p < 0,001$). Houve aumento marginal dos níveis de 5-HT na MCPVL do grupo ECMI em relação aos níveis ventrolaterais do grupo Controle ($t = 1,813$; $p = 0,07$). Também houve aumento estatisticamente significativo entre os níveis de 5-HT da MCPD do grupo ECMI em comparação aos níveis da MCPVL do grupo Controle ($t = 6,735$; $p < 0,0001$; $n = 12$). Tanto o grupo ECMI ($t = 4,968$; $p < 0,0001$) quanto o grupo Controle ($t = 3,122$; $p < 0,05$) apresentaram maior nível de 5-HT na MCPD em relação à MCPVL (Figura 12).

Quanto aos níveis de 5-HIAA, não houve diferença estatística nas comparações entre os grupos ECMI e Controle, pela ANOVA de um fator ($F_{3,49} = 1,095$; $p = 0,3602$) (Figura 12).

Em relação a TR-5HT, a ANOVA de um fator detectou diferenças estatisticamente significantes ($F_{3,48} = 8,773$; $p < 0,0001$). Houve aumento estatisticamente significativo ($t = 3,575$; $p < 0,001$) na TR-5HT na MCPVL do grupo Controle em relação à mesma região da MCPA do grupo ECMI, sem observação de diferença estatística entre os grupos na MCPD ($t = 1,171$; $p = 0,25$). Houve aumento estatisticamente significativo para a TR-5HT na MCPVL ($6,02 \pm 1,53$ ng/g) do grupo Controle em relação a TR-5HT na MCPD ($2,16 \pm 0,30$ ng/g) do mesmo grupo Controle ($t = 3,725$; $p < 0,001$), não visto na comparação entre a TR-5HT dorsal e ventrolateral do grupo ECMI ($t = 1,333$; $p = 0,19$). Houve aumento estatístico na TR-5HT na MCPVL do grupo Controle em comparação a MCPD do grupo ECMI ($t = 4,962$; $p < 0,0001$), sem diferença estatística na TR-5HT na MCPD do grupo Controle em relação a MCPVL do grupo ECMI ($t = 0,156$; $p = 0,88$) (Figura 12).

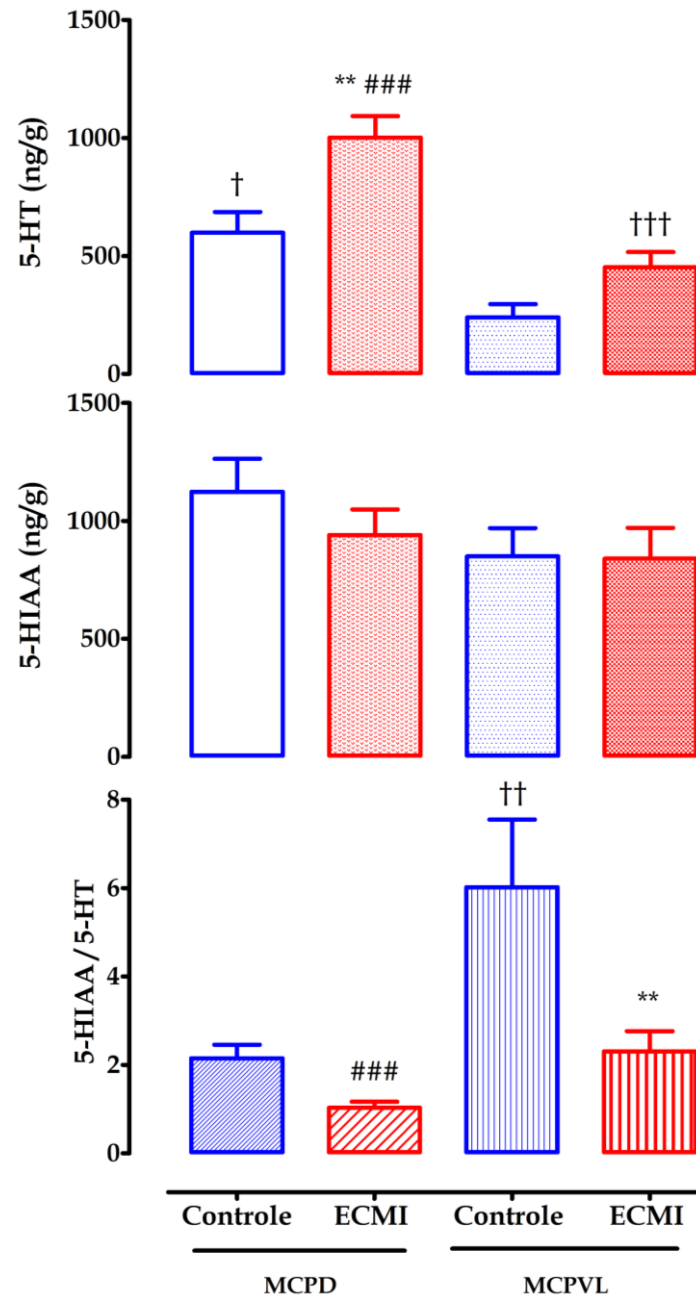


Figura 12 - Níveis de 5-HT, 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT (TR-5HT) nas regiões dorsal (MCPD) e ventrolateral (MCPVL) da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos controles (barras em azul) e de ratos expostos ao estresse crônico moderado imprevisível (ECMI) (barras em vermelho). Os dados representam a média \pm EPM. ** $p < 0,001$, diferente do grupo Controle da mesma região da MCPA; ### $p < 0,0001$, diferente do grupo Controle da outra região da MCPA; † $p < 0,05$, †† $p < 0,001$, ††† $p < 0,0001$, diferente do mesmo grupo em regiões distintas (teste ANOVA, seguido de comparações *post hoc* corrigidas para o critério de 5% de Bonferroni).

Efeitos do ECMI sobre a concentração de CORT

Embora ligeiramente maior nos animais estressados, não houve diferenças significantes ($p > 0,05$) nos níveis de CORT (ng/mL) entre os grupos ECMI ($183,1 \pm 33,4$) e Controle ($112,2 \pm 30,8$) ($t_{27} = 1,552$; $p = 0,1324$) (Figura 13).

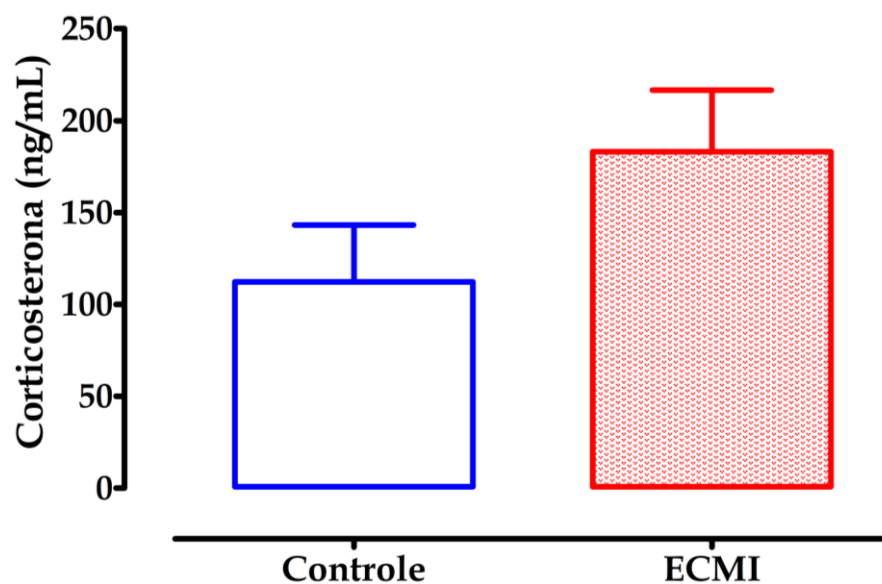


Figura 13 - Níveis plasmáticos de corticosterona em ratos submetidos ao estresse crônico moderado imprevisível (ECMI) e no grupo Controle. Os dados representam média (ng/mL) \pm EPM.

DISCUSSÃO

Ratos expostos ao ECMI sofreram aumento dos níveis de 5-HT na MCPA, sobretudo na MCPD, sem alterações nos níveis de 5-HIAA. As alterações serotoninérgicas acompanharam de elevações dos níveis plasmáticos de CORT nos animais estressados, ainda que sem significância estatística.

A 5-HT parece ser um forte candidato em mediar os eventos estressantes, inclusive com atuação no controle dos estados aversivos, ainda que o sistema serotoninérgico não responda de forma uniforme (Deakin e Graeff, 1991; Bailey *et al.*, 1993). De fato, a exposição de animais a eventos adversos em determinada fase da vida está associada a disfunções nos sistemas monoaminérgicos, com aumentos de 5-HT e de 5-HIAA no NDR e 5-HIAA no NAc ao estresse longo, além de menores níveis do neurotransmissor e metabólito na amígdala ao estresse breve (Arborelius e Eklund, 2007). Ainda, o estressor exercício físico extenuante em ratos, por exemplo, tem sido apontado em aumentar os níveis de 5-HT e 5-HIAA cerebral, com elevações do metabólito no mesencéfalo e estriado (Bailey *et al.*, 1993). Em outro estudo, foi observado um aumento da razão 5-HIAA/5-HT no hipocampo de ratos expostos ao estresse crônico variado (Gamaro *et al.*, 2003). Todavia, em animais com o avançar da idade e submetidos a tarefas de aprendizagem e memória, foram encontrados níveis reduzidos de 5-HIAA no hipocampo e diminuição do *turnover* serotoninérgico no NDR e no hipocampo (Oliveira-Silva *et al.*, 2007).

Por outro lado, outros autores observaram níveis elevados de 5-HIAA na área pré-óptica, amígdala, hipocampo, córtex entorrinal e medula espinhal, além de valores elevados da razão 5-HIAA/5-HT no mesencéfalo e medula espinhal de ratos sob estresse de subordinação aos ratos dominantes, o que pareceu representar um substrato biológico para um padrão bem definido de alterações nos comportamentos defensivos (Blanchard *et al.*, 1991). É sugerido que o excessivo estresse pré-natal pode induzir a vulnerabilidades e interromper o desenvolvimento de neurônios serotoninérgicos (Miyagawa *et al.*, 2014). Todavia, recentes resultados de nosso laboratório mostraram que o inegável estresse de isolamento social neonatal de ratos não suscitou efeitos diferenciados sobre o metabolismo serotoninérgico na MCPA desses animais quando na fase adulta (Rosa, 2012).

O presente estudo mostrou que o grupo exposto ao ECMI apresentou aumento significativo de 5-HT na MCPD e um aumento marginal na MCPVL, sem alterações nos níveis de 5-HIAA na MCPA. A menor TR-5HT nas duas regiões da MCPA dos animais estressados parece sugerir que o aumento da síntese de 5-HT foi devido à exposição imprevisível do conjunto de estressores de intensidade moderada. Ainda, estudos de microdiálise durante a exposição de animais ao estressor choque mostraram que enquanto a concentração extracelular de 5-HT na MCPD é aumentada no grupo com capacidade de controlar ou se esquivar do estresse (grupo CE), permaneceu inalterada a concentração no grupo de exposição inescapável (grupo CI) (Amat *et al.*, 1998). Como em nosso estudo, os autores não observaram alteração significativa dos níveis de 5-HIAA. Assim, nossos resultados sugerem que os aumentos dos níveis de 5-HT na MCPD e marginalmente na MCPVL foram devidos ao aumento da síntese do neurotransmissor, e não à redução de sua metabolização.

Considerando a incontrollabilidade dos animais ao ECMI e abordagens em trabalhos prévios, parece razoável aceitar que tal situação de estresse crônico pode facilitar o desenvolvimento da depressão (Maier e Watkins, 2005; Maier *et al.*, 2006). Por outro lado, é apontada uma possível plasticidade na circuitaria ativada do CPFvm que mantém inibidos o tronco cerebral e estruturas límbicas após experiência de controle sobre o estressor, permitindo a resiliência (Maier e Watkins, 2010). Sugere-se ainda que a controlabilidade do estresse também seja detectada pelas áreas pré-límbica e infralímbica do CPF medial que se projetam para o NDR e MCPAdl e MCPAvl, respectivamente (Floyd *et al.*, 2000; Gabbott *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006; Pryce *et al.*, 2011). Embora estas projeções sejam predominantemente glutamatérgicas, elas fazem sinapse com interneurônios gabaérgicos do NDR, inibindo a liberação de 5-HT sob condições de estresse controlável (Celada *et al.*, 2001; Jankowski e Sesack 2004; Pryce *et al.*, 2011). Adicionalmente, respostas agudas do sistema serotoninérgico podem resultar em efeitos crônicos, por meio de alterações sinérgicas com outros sistemas de sinalização, incluindo o CRH, neuropeptídeo Y, BDNF e o neuropeptídeo substância P (Siuciak *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2004; Berton *et al.*, 2007).

Dados de nosso laboratório de ratos submetidos ao estresse incontrollável de choque nas patas apresentaram uma atenuação dos comportamentos de imobilidade tensa (*freezing*) e fuga (*flight*) evocados pela estimulação da MCPD, em um modelo de ataque de pânico, sugerindo uma inibição do sistema motivacional sobre a região, o que

parece explicar a vida difícil de pacientes depressivos com o estresse diário (Schenberg, 2010; Quintino-dos-Santos, 2013). Somam-se a isso, dados recentes de nosso laboratório em que animais expostos ao estresse de separação maternal e submetidos ao CI na fase adulta apresentaram aumentos significativos de 5-HT na MCPVL, enquanto o grupo exposto ao CE apresentou aumento dos níveis desse neurotransmissor na MCPD (Rosa, 2012). Desse modo, parecem tornar contundentes os mecanismos distintos da 5-HT na MCPA para o controle ou proteção do organismo frente às mais variadas adversidades cotidianas, inclusive com potencialidades em alterar os limites da variação do sistema fisiológico para a busca adaptativa (McEwen e Wingfield, 2003; Peters e McEwen, 2012).

Interessantemente, é proposto que a projeção do NMnR ao hipocampo atuaria como substrato para esse sistema de resiliência (Deakin e Graeff, 1991). A ousada hipótese desses autores explica os ataques de pânico pela disfunção das projeções serotoninérgicas inibitórias do NDR para a MCPD às ameaças proximais, medo inato ou anoxia. Para as ameaças distais, os autores explicam a ansiedade generalizada pela hiperatividade das projeções excitatórias do núcleo ao CPF, amígdala e hipotálamo (Deakin e Graeff, 1991; Graeff, 2003). Assim, a 5-HT parece exercer uma função central nas doenças psiquiátricas, como depressão e ansiedade, induzidas pelo estresse persistente (Shikanai *et al.*, 2013).

Considerando estudos prévios em que a concentração de 5-HT dos núcleos da rafe de ratos apresentou variações rítmicas ao longo do dia, com concentrações mais altas na fase de escuro e de maior atividade dos animais, com nível máximo às 21 h e mínimo às 5 h, procuramos evitar o máximo de interferências sobre as variáveis protocoladas em nosso estudo, com obtenção pela manhã das amostras de tecido cerebral para dosagem de 5-HT (Pinato *et al.*, 2004).

Outros estudos têm demonstrado que o sistema serotoninérgico modula os efeitos dos glicocorticóides nos transtornos do humor, bem como regula a expressão de receptores glicocorticóides e mineralocorticóides (Seckl e Fink, 1992; Zhou *et al.*, 2008). Estudos *in vitro* e *in vivo* apontam prejuízos do estresse no sistema serotoninérgico, em que os glicocorticóides diminuem a expressão de receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos no hipocampo e no córtex cerebral, estruturas envolvidas nos estados de depressão e ansiedade (Flügge, 1995; Nishi e Azmitia, 1996; Meijer *et al.*, 1997;

Carrasco e Van de Kar, 2003). Ademais, assim como ocorre no tratamento com antidepressivos na remissão clínica de um episódio depressivo, tem sido sugerida e estudada a reversão de anomalias do eixo HHA pela ação de 5-HT na MCPD (Belmaker *et al.*, 2008). Por outro lado, os receptores 5-HT_{1A} na MCPAl e na MCPAdl desempenham uma importante função na modulação de vias descendentes cardiovasculares do hipotálamo dorsomedial, o que resulta em respostas cardiovasculares ao estresse emocional (Villela *et al.*, 2009). Mudanças comportamentais, neuroanatômicas e eletrofisiológicas acompanham o prejuízo funcional do receptor 5-HT_{1A} na área córtico-límbica, após exposição ao estressor choque nas patas (Shikanai *et al.*, 2013).

É tentador especular que no nosso estudo as alterações serotoninérgicas provocadas pelo ECMI também podem ter influenciado nos níveis alterados de CORT. Como no ECMI de Willner e colaboradores (1987), o estresse não alterou significativamente os níveis de CORT, ainda que os autores encontraram menor concentração sérica de CORT após administração de antidepressivos tricíclicos. Ainda, a exposição repetida a estressores de intensidade moderada pode produzir uma atenuação da responsividade do eixo HHA (adaptação ou habituação), contudo um novo estressor pode suscitar aumento da resposta do eixo (sensibilização) como mecanismo adaptativo (Weiberg *et al.*, 2009). Tal adaptação é dependente dos fatores variabilidade individual, modalidade do estressor, intensidade do estresse e o intervalo de tempo entre as sessões estressoras do estresse crônico (Puglisi-Allegra *et al.*, 1991; Lachuer *et al.*, 1994). Particularmente a 5-HT pareceu mediar a resiliência em todo o processo de enfrentamento das adversidades (Deakin e Graeff, 1991; Garmezy, 1991; Pinheiro, 2004). Ademais, o substrato de um “sistema comportamental de resiliência” voltado à adaptação em situações estressantes e para a perfeita separação das atividades diárias dos eventos aversivos apresentados, é atribuído às projeções serotoninérgicas do NMnR para o hipocampo, ainda que considerado na hipótese o envolvimento da MCPA (Deakin e Graeff, 1991).

Para todos os efeitos, no modelo de estresse adotado consideramos as versões original e moderada de estresse crônico, contudo com adaptações exploradas em outros trabalhos e condições disponíveis em nosso laboratório (Katz, 1982; Forbes *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 2000; Pacák e Palkovits, 2001; Willner, 2005). Viabilizamos a

apresentação de estresse crônico envolvendo fatores estressantes naturalísticos proporcionais ao estresse humano diário (Gronli *et al.*, 2006).

Nossos resultados sugerem que os níveis de 5-HT na MCPD e nem tanto na MCPVL estão correlacionados à controlabilidade do ECMI, uma evidência do envolvimento do sistema serotoninérgico nos mecanismos de resiliência após exposição de animais a esse estresse. Indubitavelmente, o perfil do metabolismo serotoninérgico na MCPA sustenta a crítica à reação inespecífica do estresse e sugerem que cada estressor ou particularmente o conjunto deles possui um perfil neuroendócrino próprio (Selye, 1936; Mason, 1971; Pacák *et al.*, 1998). Parece razoável considerarmos que tal regime crônico de estresse suscitou maior exigência de mecanismos homeostáticos, explicitada na maior síntese de 5-HT, ainda que com aumento não significativo de CORT nos animais expostos ao ECMI, inclusive com potenciais repercussões patológicas (Buckingham, 2006; Goldstein, 2010). É tentador especular que esses resultados sugerem adaptação fisiológica dos animais expostos ao evento estressante, inclusive tendo a MCPA como substrato envolvido na integração de respostas a estímulos potencialmente ameaçadores ou estressantes (Bittencourt, 2003).

ESTUDO II:

**EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO MODERADO IMPREVISÍVEL SOBRE OS
COMPORTAMENTOS DOS TIPOS ANSIOSO E DEPRESSIVO EM RATOS ADULTOS**

RESUMO

Dados clínicos e epidemiológicos sugerem que a incontrolabilidade no estresse crônico facilita o desenvolvimento da depressão. O impacto do estresse depende do tipo do estressor que o organismo está sendo exposto, das condições do indivíduo afetado, da sua responsividade ao problema e do histórico de eventos estressantes. Ademais, estudos sugerem uma possível comorbidade entre ansiedade e depressão. Nos animais, o impacto fisiológico e padrão comportamental dependem da modalidade, intensidade, frequência e duração do evento estressante. O presente estudo examinou os efeitos do estresse crônico moderado imprevisível (ECMI) sobre os comportamentos do tipo ansioso nos testes labirinto em cruz elevado (LCE) e campo aberto (CA) e do tipo depressivo nos testes hedônico (HED) e natação forçada (NF) em ratos (n = 16, grupo ECMI; n = 14, grupo Controle). O ECMI, por 9 dias (PN70-PN78), foi realizado com exposições intermitentes e variadas de estressores moderados. Em PN79, os ratos eram submetidos aos testes HED e LCE, seguido do teste CA e pré-exposição ao nado forçado em PN80 e teste NF em PN81. Diferentemente do grupo Controle, o grupo ECMI sofreu significativa perda de peso corporal ao fim do experimento. A ingestão de água foi significativamente menor no grupo ECMI, sem diferença estatística entre os grupos na ingestão e na preferência por sacarose (PPS). Não houve diferença estatística entre os grupos ECMI e Controle nos testes LCE, CA e NF. O ECMI constitui um modelo capaz de avaliar o impacto do estresse sobre o peso corporal e sobre a ingestão de água, ainda que existam fatores interferentes sobre as respostas comportamentais.

INTRODUÇÃO

O conceito de estresse de Hans Selye (1936), com explicitações de uma reação inespecífica e estereotipada do organismo às demandas externa e interna do corpo, é depreendida como condição desafiante da homeostase em vencer as forças adversas (Selye e Fortier, 1949; Selye, 1973; Selye, 1974). Todavia, as distintas respostas simpáticas e neuroendócrinas com as variações de intensidades dos estressores sugerem que cada estressor possui um perfil neuroendócrino próprio no estresse (Mason, 1971; Pacak *et al.*, 1998). Segundo McEwen (1998), alostase se aplica a condição da homeostase sustentada na presença do estressor, indicando uma sobrecarga para o organismo (carga alostática). Por outro lado, o estresse é caracterizado por aumento da liberação dos hormônios CRH, ACTH e CORT (Guyton e Hall, 2006; Ulrich-Lai e Herman, 2009). De fato, as atividades do eixo HHA e do sistema nervoso simpático se mostram pronunciadas, incluindo a liberação de PRL, no estresse agudo em humanos e em animais (Krulich *et al.*, 1974, Mioduszewski *et al.*, 1982; Dijkstra *et al.*, 1992).

Interessantemente, o impacto do estresse depende do tipo do estressor que o organismo está sendo exposto (crônico ou agudo, controlável ou incontrolável), das condições do indivíduo afetado, da responsividade ao problema e do histórico de eventos estressantes (Anisman e Merali, 1999; Paykel, 2001). A incontrolabilidade no estresse crônico pode facilitar o desenvolvimento da depressão, inclusive com evidências epidemiológicas das respostas e sintomas do transtorno depressivo (Alfonso *et al.*, 2005; Maier e Watkins, 2005, 2010; Maier *et al.*, 2006; Hammack *et al.*, 2012).

De utilização na pesquisa básica experimental, o paradigma de ECM, com origem nas observações de Katz (1982) e modificado por Willner (1987), busca a exposição de animais a estressores amenos, como a restrição de água e comida, alteração da temperatura ambiental, iluminação contínua ou inclinação da gaiola-casa, podendo revelar comportamentos anedônicos nos animais (Willner *et al.*, 1992; Willner, 1997; Willner e Papp, 1997; Willner, 2005). De fato, o estresse crônico variável pode levar à redução significativa no consumo de alimento doce, situação revertida pela administração de fluoxetina, um inibidor seletivo de receptação da serotonina (Gamero, 1998; Willner, 2005). Ainda, em estudos com animais sobre hedonia, o consumo de sacarose 1 % tanto pelos ratos *Lister hooded* quanto nos ratos *Long-Evans* foi suprimido

após exposição dos animais ao ECM, resultando em um estado anedônico claro (Willner *et al.*, 1992). A concentração utilizada pelos autores foi referida como adequada à função ingestão-concentração na curva em U invertido (Willner *et al.*, 1992). Adicionalmente, o estado depressivo dos animais pode ser refletido no comportamento de imobilidade no teste NF em animais experimentais (Porsolt *et al.*, 1977).

Ademais, tanto a diminuição da atividade exploratória quanto os efeitos lesivos sobre a memória espacial são observados após o estresse crônico (Garcia-Marquez e Armario, 1987; Conrad *et al.*, 1996; Nishimura *et al.*, 1999). Tamanha responsividade, animais expostos ao estresse crônico variado, estresse moderado ou estresse agudo podem sofrer uma severa perda de peso corporal (Harris *et al.*, 1998, 2002; Gamaro *et al.*, 2003). Adicionalmente, as repercussões patológicas parecem estar mais associadas com o estresse crônico, em que há maior exigência dos mecanismos homeostáticos na hiperexposição do organismo aos agentes estressores (McEwen e Magarinos, 1997; Buckingham, 2006; Goldstein, 2010; Abelaira *et al.*, 2013). Por outro lado, o estresse crônico pode estar também envolvido na origem de transtornos de ansiedade, transtornos alimentares e alterações na formação de memórias (Chrousos, 2007; Li *et al.*, 2008; Buynitsky e Mostofsky, 2009; Epel, 2009).

A exposição de ratos adultos e primatas ao estresse crônico pode resultar em danos cognitivos no desempenho de distintas tarefas, tais como labirinto radial de oito braços e labirinto aquático (Bodnoff *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1999). Ainda, o efeito ansiogênico do estresse em animais também é apontado no teste LCE, em que são observados a diminuição do número de entradas nos braços abertos e o comportamento de congelamento (*freezing*) (File, 1996; Padovan *et al.*, 2000; Zurita *et al.*, 2000). A ansiedade é provocada pelo conflito entre a motivação de explorar e a aversão aos braços abertos (Carobrez e Bertoglio, 2005). Adicionalmente, a atividade exploratória no teste CA tem sido alterada nos animais cronicamente estressados (D'Aquila *et al.*, 2000). Portanto, parece razoável depreender das condições de estresse que um ambiente não apropriado pode suscitar respostas não adaptativas, expressas nos transtornos comportamentais e identificadas por comportamentos estereotipados, distúrbios emocionais e *deficit* cognitivo, entre outras vulnerabilidades (Boere, 2001; Charney e Manji, 2004; Selye, 1973). Hipotetiza-se alterações comportamentais depressivas e ansiosas nos animais expostos ao ECMI em relação aos controles não estressados. Para tanto, objetivou-se avaliar esses comportamentos por LCE, CA, NF e HED.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados ratos machos, espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar* (n = 30), após período de amamentação de 21 dias (21º dia pós-natal ou PN21) e pesando entre 90-100 g, provenientes do Biotério do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais dos grupos experimentais foram mantidos agrupados em gaiolas-casa de polipropileno (60 cm x 50 cm x 22 cm) com assoalho coberto por serragem, na Sala de Estresse, até o início da ativação dos estressores, quando o grupo Controle foi realocado para a Sala Sem Estresse. Os animais pesavam entre 300-400 g ao início dos experimentos (PN70).

Foram assegurados registros de temperatura, intensidades luminosa e sonora e umidade nas duas salas experimentais. Assegurou-se também a higienização das gaiolas-casa e fluxo de ar por exaustor, além da oferta de ração padronizada e água *ad libitum*, salvo quando não convenientes ao propósito experimental. O monitoramento do ambiente dos animais foi sustentado desde o Biotério.

Foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, concea.mct.gov.br), que estão em conformidade com as normas internacionais de pesquisas científicas envolvendo animais. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do CCS/UFES, nº 066/2012. Os procedimentos foram conduzidos com minimização de dor e menor desconforto possível.

Procedimentos

Paradigma de estresse crônico moderado imprevisível

Buscou-se a construção modificada do modelo de estresse crônico proposto inicialmente por Katz e colaboradores (Katz e Schmaltz, 1980; Katz *et al.*, 1981) e posteriormente alterado por Wilner (1997). Todavia, para o propósito do estudo, foi definida uma apresentação imprevisível de distintas combinações de estressores de intensidade moderada, adaptações exploradas em outros trabalhos (Forbes *et al.*, 1996;

Nielsen *et al.*, 2000; Pacák e Palkovits, 2001) e condições disponíveis em nosso laboratório. Os animais foram alocados aleatoriamente nos grupos ECMI (n = 16) e Controle (n = 14) e foram individualmente identificados (Figura 14).

Ainda, os pesos corporais dos animais foram registrados (balança eletrônica Filizola, BP15, São Paulo, Brasil) em dois momentos, em PN70 e PN78.

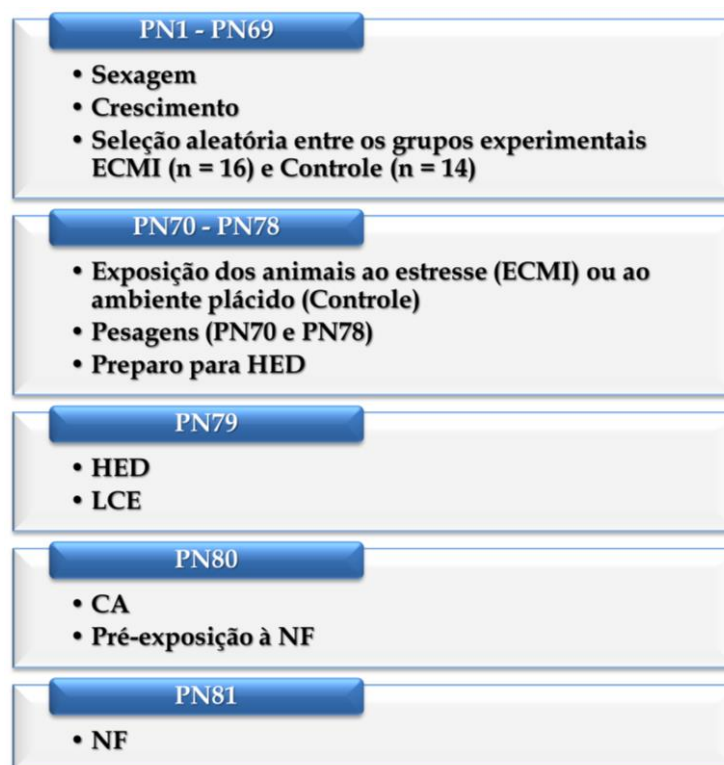


Figura 14 - Cronograma experimental com os eventos subsequentes entre os grupos Controle e ECMI a partir da sexagem (PN1). CA, teste campo aberto; ECMI, estresse crônico moderado imprevisível; HED, teste hedônico; LCE, teste labirinto em cruz elevado; NF, teste natação forçada.

Para o ECMI, buscou-se reunir estressores moderados conhecidos (Willner *et al.*, 1992; Pucilowski *et al.*, 1993). Os ratos do grupo ECMI foram por 9 dias expostos aos estressores: agitação intermitente, ambiente frio, alta umidade, luz contínua, luz estroboscópica, ruído, assoalho descoberto (sem maravalha), gaiola-casa suja e molhada, bebedouro vazio e restrição alimentar (Figura 6, Estudo I).

Por outro lado, os animais do grupo Controle foram alojados na Sala Sem Estresse, sob condições controladas de iluminação (luz acesa das 6 h às 18 h; 58 lx de

intensidade luminosa), umidade (inferior a 60 %), temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ruído (46 dB, majoritariamente do sistema de condicionamento e exaustão de ar).

Foram mantidos os mesmos procedimentos empregados no Estudo I referentes ao modelo de ECMI. Todavia, em PN77 (8º dia de ECMI), os animais de ambos os grupos foram privados de água e ração por 24 h (das 8 h de PN77 às 8 h de PN78) para a condução de HED em PN79. Ainda, foi proporcionada a pré-exposição dos animais à sacarose 1 %, em PN78, para a efetividade de HED em PN79.

Subsequentemente ao ECMI, os animais dos grupos experimentais foram submetidos à avaliação dos comportamentos dos tipos ansioso (LCE e CA) e depressivo (NF e HED) (Figura 14).

Teste hedônico

Inicialmente, os animais foram submetidos a privação de água e ração por 24 h em PN77. Em PN78, foi ofertada exclusivamente a solução de sacarose 1 % (sacarose P.A., Neon Comercial, São Paulo, Brasil). Esses procedimentos consistiram no pré-teste de HED, para assimilação da solução açucarada.

Às 8 h de PN79, foram ofertados dois bebedouros, cada um contendo 700 mL de água ou solução de sacarose 1 % (teste de duas garrafas), por 900 s (15 min). Os bebedouros foram alternados de posição na gaiola-casa depois de decorridos 600 s (10 min) de teste. Ao fim do teste, foram mensurados os volumes ingeridos de cada bebedouro.

Em paralelo, foi conduzido o teste de preferência por sacarose (PPS). A preferência por sacarose 1 %, expressa em valores percentuais, foi calculada pela razão entre a ingestão de solução de sacarose 1 % e a ingestão total (volume ingerido de sacarose 1 % somado ao volume ingerido de água), durante 900 s de teste, multiplicada por 100. O procedimento foi filmado (câmera digital, Sony Cyber-shot, DSC-W690, 16,1 MP, Tóquio, Japão) e atribui-se ingestão e preferência por gaiola-casa, via adotada para se evitar a segregação dos animais experimentais e um possível viés metodológico (Figura 15).



Figura 15 - Fotografias dos testes comportamentais. a, bebedouros utilizados no teste hedônico (HED) (um com água e outro com solução de sacarose 1 %) para avaliar comportamentos do tipo depressivo. b, teste labirinto em cruz elevado (LCE) utilizado na avaliação de comportamentos do tipo ansioso. c, teste campo aberto (CA) utilizado na avaliação de comportamentos do tipo ansioso. d, teste natação forçada (NF) utilizado na avaliação de comportamentos do tipo depressivo.

Teste labirinto em cruz elevado

O teste LCE é fundamentado na aversão natural dos roedores a espaços abertos. O labirinto utilizado foi construído em madeira e revestido de fórmica. Situado a 70 cm do assoalho, é formado por quatro braços perpendiculares de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, dos quais dois braços opostos apresentam paredes de 40 cm de altura (braços fechados e seguros) e os outros dois braços apresentam bordas de apenas 1 cm de altura (braços abertos e inseguros). Os braços se comunicam por uma plataforma central (10 x10 cm) (Zangrossi e Graeff, 1997; Carobrez e Bertoglio, 2005).

Em PN79, após HED, o animal era posicionado na plataforma central, voltado para o braço fechado e suas atividades eram filmadas durante o período de 5 min, momento de término do teste. Entre cada sessão experimental, o aparato era devidamente higienizado com álcool etílico 70 %. Os vídeos foram posteriormente analisados, registrando-se os tempos de exploração nos braços abertos (TBA) e fechados (TBF), o tempo de exploração na plataforma central (TPC) e o número de entradas nos braços abertos (EBA) e fechados (EBF). Utilizou-se, para o propósito, um cronômetro digital (YP-2151, Technos, Manaus, Brasil). A porcentagem de entradas (%)

EBA) e de tempo (% TBA) nos braços abertos foram calculados pelas razões $EBA/(EBA+EBF)$ e $TBA/(TBA+TBF)$, respectivamente, multiplicadas por 100. O teste LCE foi executado na Sala de Comportamentos, dotada de isolamento acústico (paredes de cor branca em gesso acartonado, com 7,3 cm de espessura de gesso para *drywall*, com lã acústica interna 73/48/600/1ST/1ST), 60 lx de iluminação, 23 ± 2 °C de temperatura, umidade inferior a 60 % e 64 dB de ruído (majoritariamente do sistema de exaustão de ar) (Figura 15).

Teste campo aberto

O teste campo aberto (CA) foi realizado em PN80. Os animais foram posicionados individualmente na periferia de uma arena quadrangular de 1 m de aresta, com paredes circundantes de madeira revestidas em fórmica e assoalho de acrílico, dividido em 49 quadrados. Foram filmadas, em todo o teste de 5 min de duração, as atividades de cada animal no assoalho do aparato, dividido em uma região central (18,36 % da área quadrangular) e uma região periférica (Figura 15). Entre cada sessão experimental, o aparato foi devidamente higienizado com álcool etílico 70 %. Foram mensurados o tempo de locomoção periférica ou peritaxia (s) e o percentual de locomoção central ou centrotaxia ($[\text{centrotaxia}/(\text{centrotaxia}+\text{peritaxia})]*100$) sob uso de cronometragem manual, calculados posteriormente pela análise dos vídeos. O teste foi realizado na Sala de Comportamentos.

Teste natação forçada

O teste natação forçada (NF) foi realizado em PN81, 24 h após sessão pré-teste de 15 min (assimilação) do evento inescapável de nado forçado ou desespero experimental. Cada animal foi posicionado em um aparato cilíndrico de aço inoxidável (28,5 cm de diâmetro x 62 cm de altura, coluna d'água de 54 cm a 23 °C). Foi filmado, em todo o NF de 5 min de duração, o comportamento de natação, definido como o nado propriamente dito (nado ativo ou mergulhos) e imobilidade (nado passivo ou flutuação), em que o animal permanecia praticamente imóvel, apresentando apenas pequenos movimentos para manter a cabeça fora da água (Figura 15). O tempo de imobilidade foi calculado posteriormente pela análise dos vídeos sob cronometragem manual.

Análise Estatística

Os dados de peso foram comparados utilizando o teste t de Student pareado. Os resultados dos testes LCE, CA, NF, HED foram analisados utilizando o teste t de Student não pareado. Todos os valores foram expressos em média \pm EPM e foi adotado o nível de significância de 5 %. O *software* Graph Pad Prism v.5.01 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para a análise estatística e representação gráfica.

RESULTADOS

Efeito do ECMI sobre o peso corporal

Os pesos corporais dos animais foram monitorados ao longo do protocolo experimental (P70 e P79). No início do protocolo não houve diferença significativa entre os grupos ($t_{28} = 0,1946$; $p = 0,8471$). Todavia, ao fim do experimento, enquanto houve significativo ganho de peso corporal no grupo Controle ($t_{13} = 3,031$; $p < 0,001$), o grupo ECMI sofreu perda de peso estatisticamente significativa ($t_{15} = 12,62$; $p < 0,0001$) (Figura 16).

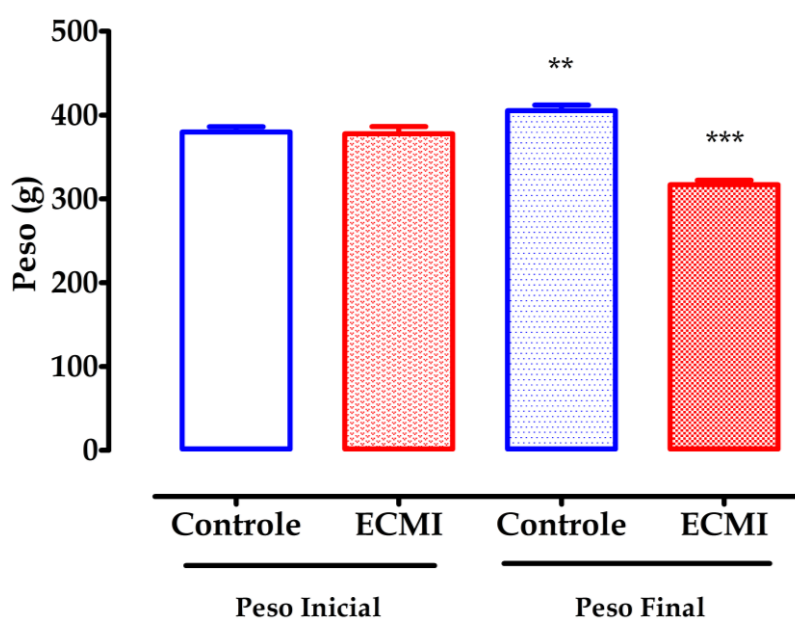


Figura 16 - Efeito do estresse crônico moderado imprevisível (ECMI) sobre o peso corporal. Grupo Controle (n = 14) com peso inicial ($379,7 \pm 6,46$ g) e peso final ($405,1 \pm 6,79$ g). Grupo ECMI (n = 16) com peso inicial ($377,6 \pm 8,66$ g) e peso final ($316,9 \pm 5,36$ g). ** ($p < 0,001$) ganho de peso no grupo Controle. *** ($p < 0,0001$) perda de peso no grupo ECMI. Teste t de Student pareado.

Efeito do ECMI sobre o desempenho dos ratos no LCE

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ECMI e Controle para % TBA ($t_{28} = 1,660$; $p = 0,1080$), % EBA ($t_{28} = 0,1739$; $p = 0,8632$) e EBF ($t_{28} = 1,852$; $p = 0,0747$) (Figura 17).

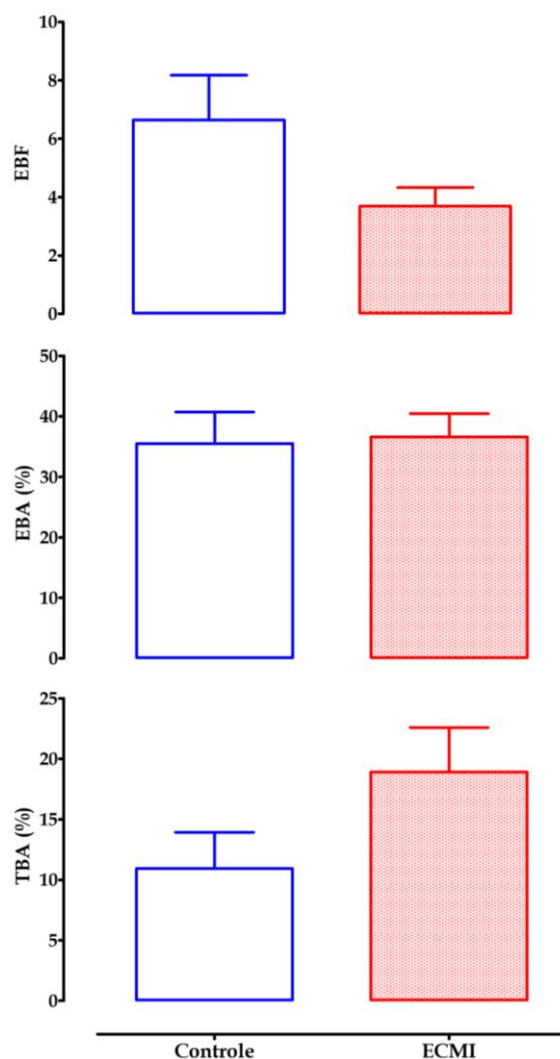


Figura 17 - Efeitos do estresse crônico moderado imprevisível sobre os ratos no teste labirinto em cruz elevado (LCE). EBF, entradas no braço fechado; % EBA, porcentagem de entradas no braço aberto; % TBA, porcentagem de tempo no braço aberto; ECMI, ratos expostos ao estresse crônico moderado imprevisível.

Efeito do ECMI sobre o desempenho dos ratos no CA

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ECMI ($298,2 \pm 0,7549$ s) e Controle ($299,3 \pm 0,3998$ s) na peritaxia ($t_{27} = 1,294$; $p = 0,2067$). Também não houve diferença entre os grupos ECMI ($0,6056 \pm 0,2477$ %) e Controle ($0,2200 \pm 0,1332$ %) no % centrotaxia ($t_{27} = 1,283$; $p = 0,2104$) (Figura 18).

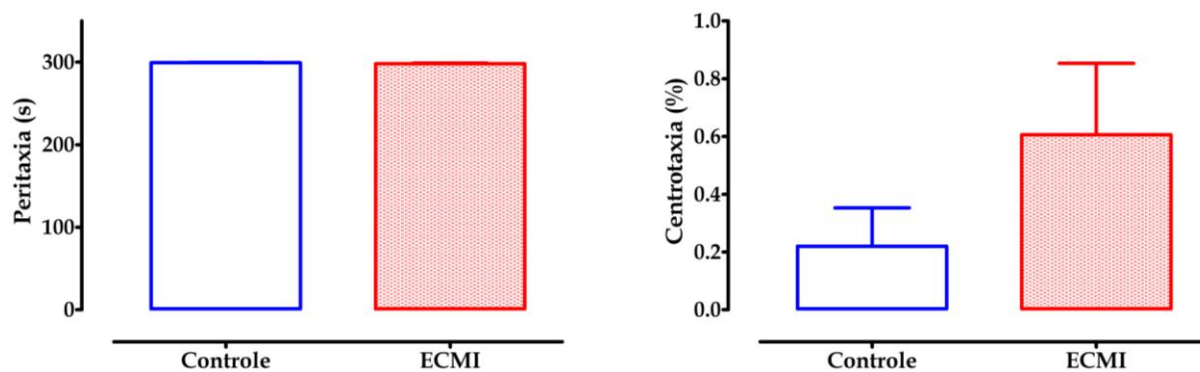


Figura 18 - Efeitos do estresse crônico moderado imprevisível sobre os ratos no teste campo aberto (CA). Centrotaxia e peritaxia, exploração no centro e na periferia do aparato, respectivamente; ECMI, ratos expostos ao estresse crônico moderado imprevisível.

Efeito do ECMI sobre o desempenho dos ratos no NF

Entre os grupos ECMI ($62,56 \pm 10,53$ s) e Controle ($57,21 \pm 14,06$ s) não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de imobilidade (nado passivo ou flutuação) ($t_{28} = 0,3091$; $p = 0,7595$) (Figura 19).

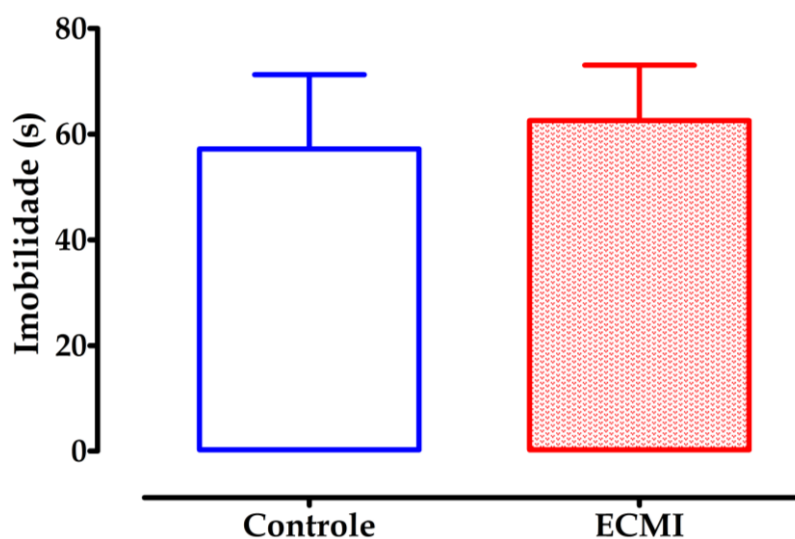


Figura 19 - Efeitos do estresse crônico moderado imprevisível sobre ratos no teste natação forçada (NF). Imobilidade, tempo de imobilidade (natação passiva); ECMI, ratos expostos ao estresse crônico moderado imprevisível.

Efeito do ECMI sobre o desempenho dos ratos no teste hedônico

O grupo ECMI ($26,25 \pm 2,394$ mL) apresentou menor ingestão de água em relação ao grupo Controle ($36,25 \pm 2,394$ mL), com diferença estatisticamente significativa ($t_6 = 2,954$; $p < 0,05$). Não houve redução estatisticamente significativa na ingestão de sacarose 1 % entre os grupos ECMI ($47,50 \pm 4,787$ mL) e Controle ($58,75 \pm 5,907$ mL) ($t_6 = 1,480$; $p = 0,1895$). Quanto ao PPS, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ECMI ($64,22 \pm 2,881$ %) e Controle ($61,49 \pm 3,441$ %) ($t_6 = 0,6100$; $p = 0,5642$) (Figura 20).

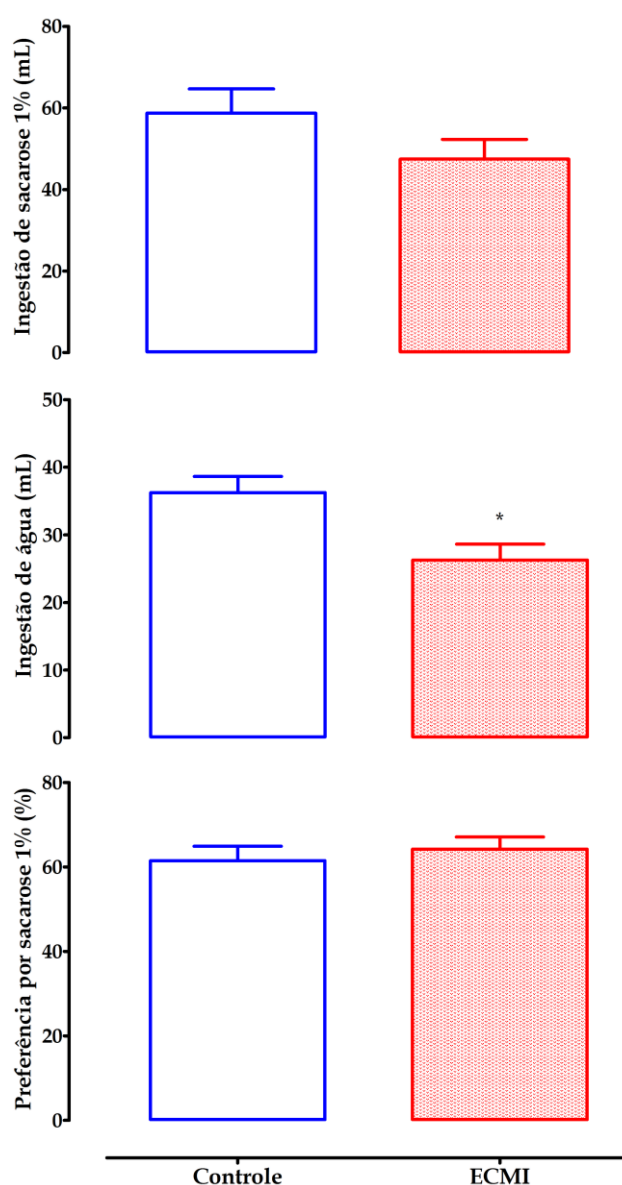


Figura 20 - Efeitos do estresse crônico moderado imprevisível sobre ratos no teste hedônico (HED). ECMI, ratos expostos ao estresse crônico moderado imprevisível. * ($p < 0,05$), teste t de Student não pareado.

DISCUSSÃO

Ratos expostos ao ECMI sofreram perda de peso corporal e menor ingestão de água no teste HED. Todavia, as diferenças das respostas comportamentais nos testes LCE, CA e NF não foram estatisticamente significantes entre os grupos experimentais.

No presente estudo, tanto os animais do grupo Controle quanto do grupo ECMI, foram criados em menor grau possível de interferências adversas, sendo garantido o monitoramento dos principais estímulos locais (sobretudo, iluminação e ruído), com acompanhamento nas salas experimentais. Procurou-se, assim, evitar o máximo de interferências sobre as variáveis protocoladas e maior fidedignidade na avaliação comportamental. Ainda, para o propósito do estudo, buscou-se a submissão dos animais a mais de uma semana de estresse crônico, dentro das possibilidades do laboratório e por um período moderado de exposição.

Willner e colaboradores (1987) encontraram redução do consumo e também da preferência por soluções de sacarose após período de exposição ao ECMI de no máximo 9 semanas. Contudo, buscou-se, neste estudo, avaliar o impacto do conjunto variado de estressores, não só intermitentes, em 9 dias de experimento. Ademais, são ponderadas as limitações do ECM às respostas depressivas, desfecho esperado do ECM, também considerado em estudos modificados e posteriores às primeiras observações de Katz (1982) (Anisman e Matheson, 2005). Como no ECMI, segundo esses autores, há fatores, nem sempre esclarecidos, que contribuem para a frequente variabilidade comportamental interindividual e que é evidenciada em paradigmas comportamentais associados ao estresse (Anisman e Matheson, 2005).

Parece oportuna neste estudo a consideração das variáveis, dada a sensibilidade do paradigma a fatores interferentes nas respostas de estresse (Anisman e Matheson, 2005). Desafiando a homeostase, e apoiando-se em outras versões experimentais, a apresentação de múltiplas combinações entre os 10 estressores do presente estudo, permitiu a construção de um ambiente moderadamente hostil, com agitação incontrolável dos animais em meio ao ambiente úmido, frio, ruidoso e incerto, inclusive com iluminação potencialmente capaz de alterar o ritmo circadiano (Forbes *et al.*, 1996; Willner, 2005; Martinowich e Lu, 2008; Pestana, 2010).

Os resultados deste estudo parecem refletir a variabilidade nos animais e a responsividade diferenciada às modalidades do estressor, intensidade do estresse e intervalo de tempo entre as sessões estressoras, condições consideradas no estudo de dependência de fatores para a adaptação ou habituação ao estresse (Lachuer *et al.*, 1994).

A alternância das gaiolas-casa viabilizou a aproximação e distanciamento dos animais das fontes de estresse e seus estímulos ameaçadores, uma apresentação notadamente aversiva observada pelo afugentar dos animais em direção oposta aos estressores. Autores têm procurado explicar a integração e expressão de comportamentos exibidos diante do perigo proximal e potencial, incluindo informações mnemônicas, em circuito neural crucial aos mecanismos defensivos, com intensas projeções aferentes e eferentes nas áreas específicas da amígdala, tálamo, sistema septo-hipocampal e MCPA (Cezário *et al.*, 2008; Canteras, 2008). Neste sentido, por exemplo, o odor ou som de um felino são estímulos que sinalizam aos ratos a presença potencial do predador, desencadeando reações fisiológicas e comportamentais de defesa (Blanchard *et al.*, 1993; Blanchard e Blanchard, 1998).

O modelo de ECMI aplicado suscitou, possivelmente, reações do organismo às demandas externas e internas do corpo, situação de resposta ao estresse, incluindo o perfil neuroendócrino próprio (Selye, 1936; Selye e Fortier, 1949; Selye, 1973; Mason, 1971; Pacak *et al.*, 1998; Anisman e Merali, 1999; Paykel, 2001). Ademais, a imprevisibilidade dos estímulos, os tipos de estressores e as variações na duração e na intensidade do estresse, não só são capazes de alterar ao menos alguma das respostas comportamentais do estresse, como também podem suscitar respostas fisiológicas diferenciadas na apresentação individualizada do estressor (Puglisi-Allegra *et al.*, 1991; Willner *et al.*, 1992; Manoli *et al.*, 2000). O estresse do ECMI, ainda que moderado, pareceu requisitar mais dos mecanismos homeostáticos na exposição dos animais aos estresse crônico, situação considerada de repercussões patológicas em outros estudos (McEwen e Magarinos, 1997; Buckingham, 2006; Goldstein, 2010; Abelaira *et al.*, 2013).

Os resultados deste estudo mostraram que enquanto o grupo Controle ganhou peso corporal ao fim dos 9 dias de experimento, o grupo ECMI sofreu grande perda de peso corporal, com significância estatística. Nossos resultados corroboram a

responsividade do estresse crônico e variado encontrado em outros estudos, inclusive com perda de peso corporal em situações de estresse agudo (Harris *et al.*, 1998, 2002; Gamaro *et al.*, 2003). De fato, não só a anedonia, mas também a perda de peso tem sido considerada como aspecto relevante no modelo de ECM, um aspecto inclusive considerado pelo DSM-IV como um sintoma da depressão (Willner, 1997; APA, 2000; Thomaz, 2009). Adicionalmente, Willner (1997) em uma revisão de 10 anos de modelos do estresse, assinala a perda de peso comumente observada em ratos, podendo chegar até 20 % de perda em alguns casos.

Os resultados do presente estudo não mostraram diferenças estatísticas significantes na ingestão de sacarose 1 % e na preferência pela solução adocicada entre os grupos Controle e ECMI. Todavia, houve diferença estatística na ingestão de água entre os grupos, com menor ingestão pelo grupo ECMI. No entanto, a diminuição no consumo de líquidos, ainda que especialmente a de sacarose, tem sido interpretada também como uma alteração na sensibilidade à recompensa, resultante da exposição conjunta aos estímulos aversivos (Muscat *et al.*, 1992; Willner, 2005). Ademais, Thomaz (2001) mostrou que ratos expostos ao ECM apresentaram tanto a perda de peso quanto a diminuição no consumo de água, além da redução de solução de sacarose. O estresse do ECMI e seu impacto sobre o peso dos animais, ainda que sem significância estatística na ingestão de sacarose, parecem explicar certa independência dos efeitos. Corroborando essa ideia, há autores que defendem a independência da alteração do peso com a ingestão de solução de sacarose (Willner *et al.*, 1996; Willner, 1997; Konkle *et al.*, 2003). Contudo, há também opiniões contrárias a essa ideia, em que se considera a perda de peso no estresse como o causador da redução da ingestão de solução de sacarose (Forbes *et al.*, 1996; Matthews *et al.*, 1995; Di Chiara e Tanda, 1997). Se assim for, talvez o tempo ou a intensidade do ECMI adotado neste estudo possa ter sido insuficiente para se observar a redução do consumo de sacarose. Por outro lado, a concentração de sacarose 1 % foi referida como adequada à função ingestão-concentração na curva em U invertido no estudo de Willner (1992). Como ponderado neste estudo, razão também da concentração definida para a sacarose, Perez e Sclafani (1990) propuseram o uso de soluções diluídas para minimizar os potenciais efeitos calóricos e coligativos posteriores à ingestão.

Quanto à NF, o comportamento de imobilidade também pode refletir um estado do tipo depressivo nos animais (Porsolt *et al.*, 1977). Vega-Rivera e

colaboradores (2014) mostraram que o estresse crônico variado induz efeitos neurais e comportamentais nos ratos, tendo a NF como um atrativo teste para o estudo de alguns tipos de transtornos relacionados ao estresse. Todavia, neste estudo, a diferença entre os tempos de imobilidade dos grupos ECMI e Controle não se mostrou significativa. Dados prévios do laboratório mostraram a superior imobilidade na NF após a bulbectomia olfatória em ratos (Quintino-dos-Santos, 2011). Provavelmente, um protocolo de ECMI de maior intensidade e duração, seria possível a constatação do estado do tipo depressivo nos ratos na NF após o estresse. De fato, Consoli e colaboradores (2005) mostraram que a intensidade e a duração dos estressores podem afetar profundamente a resposta comportamental de ratos submetidos à NF.

Procurou-se também aplicar testes comportamentais de ansiedade após o ECMI. De fato, alguns pesquisadores têm observado comorbidade entre ansiedade e depressão (Merikangas *et al.*, 2003; Cryan & Holmes, 2005; Wegener *et al.*, 2012). Landgraf e Wigger (2002), por exemplo, mostraram que animais com altos padrões de ansiedade apresentaram comportamentos relacionados à depressão e passividade mais elevados, quando postos em confronto em uma situação de estresse. Segundo Carobrez e Bertoglio (2005), a ansiedade é provocada pelo conflito entre a motivação de explorar e a aversão aos braços abertos no LCE. Assim, o efeito ansiogênico do estresse tem sido apontado no LCE em inúmeros estudos, em que são observados a diminuição do número de entradas nos braços abertos e o comportamento de congelamento (*freezing*) dos animais (File, 1996; Padovan *et al.*, 2000; Zurita *et al.*, 2000). Contudo, no presente estudo, não houve diferença estatística entre os grupos ECMI e Controle para % EBA, % TBA e EBF no LCE. Esses resultados corroboram os de Grace e colaboradores (2009), em que eventos estressantes podem não suscitar alterações nos comportamentos do tipo ansioso no LCE (Grace *et al.*, 2009).

Dado o contexto de estresse, verifica-se, inclusive, interferências da experiência do ECMI no desempenho de tarefas experimentais. De fato, a exposição de ratos adultos e primatas ao estresse crônico, por exemplo, pode suscitar danos cognitivos no desempenho em testes realizados no labirinto radial de oito braços e no labirinto aquático (Nishimura *et al.*, 1999; Bodnoff *et al.*, 1995). Ainda, Steenbergen e colaboradores (1990) mostraram que a exposição prévia ao estressor CI promoveu efeitos ansiogênicos no LCE. A ausência de significância estatística no teste LCE após ECMI corrobora os resultados de % TBA, % EBA, sobretudo EBF entre os grupos

expostos aos estressores CE e CI no estudo de Quintino-dos-Santos (2011). Ademais, outros autores também não encontraram diferenças para os parâmetros EBA no LCE e tempo de imobilidade na NF entre grupos (Cruz *et al.*, 1994; Ramos *et al.*, 1998).

No presente estudo, a bateria de testes comportamentais foi iniciada com o LCE, seguido de CA e NF, sendo um teste por dia. Além da compreensão do impacto diverso do estresse, talvez a aproximação temporal dos testes não tenha sido a melhor possível, ainda que em período convencional, já que outros estudos mostraram interferências de uma bateria de testes com intervalos menores, como 24 h, ou até mesmo sem intervalo entre cada exposição (Fraser *et al.*, 2010). Schellinck e colaboradores (2010) também fazem o alerta da consideração do intervalo entre os testes, os tipos de testes e a sua ordem de aplicação, para se evitar as interferências (Schellinck *et al.*, 2010).

Adicionalmente, a atividade exploratória no CA tem sido alterada em animais cronicamente estressados (D'Aquila *et al.*, 2000). No presente estudo, os tempos de permanência dos animais na zona periférica do CA foram preponderantes às raras tentativas de exploração do centro do aparato, sem diferença estatística entre os grupos na peritaxia e centrotaxia. Outros autores mostraram que enquanto a diminuição da peritaxia no CA pode estar relacionada à redução dos comportamentos motivados por alimento, a redução dos cruzamentos na área central pode estar associada ao aumento da ansiedade (Leonard *et al.*, 1979; Ramos *et al.*, 1997; Ramos e Mormède, 1998). Ainda que sem diferença estatística, a permanência do grupo ECMI, na zona periférica e sem muita exploração, pode ser decorrente do estresse proposto. Ademais, segundo as observações de Luo e colaboradores (2014), houve menor locomoção dos animais no CA após estresse crônico variado por uma semana. Considerando a locomoção reduzida ou imobilidade dos animais, as observações parecem subsidiar a ideia de que a resposta de congelamento é altamente adaptativa, pois movimentos tornam o animal mais detectável por seus predadores, já que costumam atacar preferencialmente presas móveis em vez de imóveis (Fendt e Fanselow, 1999). Interessantemente, dados do laboratório mostraram também a redução na exploração de ratos no CA após estresse cirúrgico de bulbectomia olfatória, sugerindo aumento da ansiedade (Quintino-dos-Santos, 2011).

Considerados os possíveis fatores interferentes, procurou-se envolver fatores estressantes naturalísticos proporcionais ao estresse humano, como ponderado por Gronli e colaboradores (2006) em estudo sobre estresse crônico leve e variado. Por fim, são necessários mais estudos que avaliam respostas comportamentais em modelos de ECMI, já que o estresse crônico pode estar envolvido na origem de transtornos de ansiedade, além da depressão, alterações na formação de memórias e transtornos alimentares (Chrousos, 2007; Li *et al.*, 2008; Buynitsky e Mostofsky, 2009; Epel, 2009). Ademais, é tentador especular que esses resultados sugerem adaptação comportamental e fisiológica dos animais expostos ao evento estressante, inclusive tendo a MCPA como substrato envolvido na integração de respostas a estímulos potencialmente ameaçadores ou estressantes (Bittencourt, 2003).

CONCLUSÕES

1. Há efeitos diferenciados do ECMI sobre o metabolismo da 5-HT na MCPA de ratos adultos, com aumento dos níveis tissulares do neurotransmissor na MCPD e marginalmente na MCPVL;
2. O aumento da síntese de 5-HT na MCPA parece estar associado à tentativa adaptativa dos animais ao ECMI;
3. O ECMI suscitou perda de peso corporal e menor ingestão de água no teste HED, mas sem impacto nos testes LCE, CA e NF.

REFERÊNCIAS

- Abelaira HM, Réus GZ, Ribeiro KF, Steckert AV, Mina F, Rosa DVF, Santana CV, Romano-Silva MA, Dal-Pizzol F and Quevedo J (2013). Effects of lamotrigine on behavior, oxidative parameters and signaling cascades in rats exposed to the chronic mild stress model. *Neurosci Res* 75: 324-330.
- Adamec RE, Burton P, Shallow T and Budgell J (1999). Unilateral block of NMDA receptors in the amygdala prevents predator stress-induced lasting increases in anxiety-like behavior and unconditioned startle-effective hemisphere depends on the behavior. *Physiol Behav* 65: 739-751.
- Adell A, Celada P, Abellán MT and Artigas F (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev* 39: 154-180.
- Akhtar-Danesh N and Landeen J (2007). Relation between depression and sociodemographic factors. *Int J Ment Health Syst* 1: 4.
- Akil HA and MORANO MI (1995). Stress. IN: Bloom FE, Kupfer DJ (eds) *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*, pp. 773-785.
- Alfonso J, Frasch AC and Flugge G (2005). Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus. *Rev Neurosci* 16: 43-56.
- Amat J, Matus-Amat P, Watkins LR and Maier SF (1998). Escapable and inescapable stress differentially and selectively alter extracellular levels of 5-HT in the ventral hippocampus and dorsal periaqueductal gray of the rat. *Brain Res* 797: 12-22.
- Anand A and Charney DS (2000). Norepinephrine dysfunction in depression. *J Clin Psychiatry* 61: 16-24.
- Andersen SL and Teicher MH (2004). Delayed effects of early stress on hippocampal development. *Neuropsychopharmacol* 29:1988-1993.
- Anisman H (2009). Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34: 4-20.
- Anisman H and Matheson K (2005). Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 525-546.
- Anisman H, Merali Z (1999) Understanding stress: characteristics and caveats. *Alcohol Res Health* 23: 241-249.
- Antoni FA (1993). Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol* 14: 76-122.
- APA (2000). *DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association, Fourth Edition*, American Psychiatric Press Washington, DC.
- Arborelius L and Eklund MB (2007). Both long and brief maternal separation produces persistent changes in tissue levels of brain monoamines in middle-aged female rats. *Neurosci* 145: 738-750.

- Azzara AV and Sclafani A (1998). Flavor preferences conditioned by intragastric sugar infusions in rats: maltose is more reinforcing than sucrose. *Physiol Behav* 64: 535-541.
- Bailey SP, Davis JM and Ahlborn EN (1993). Neuroendocrine and substrate responses to altered brain 5-HT activity during prolonged exercise to fatigue. *Journal Applied Physiology* 74: 3006-3012.
- Bandler R and Keay KA (1996). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Brain Res* 107: 285-300.
- Bandler R, Carrive P and Depaulis A (1991). Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In A. Depaulis and R. Bandler (Eds.), *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*. Plenum Press, New York, pp 1-8.
- Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, Dadomo H, Franceschini P, Dell'Omo G, Parmigiani S and Palanza P (2009). Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *Plos One* 4(1): e4331.
- Bekris S, Antoniou K, Daskas S and Papadopoulou-Daifoti Z (2005). Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. *Behav Brain Res* 161: 45-59.
- Belmaker RH and Agam G (2008). Major depressive disorder. *NEJM* 3: 55-68.
- Berton O, Covington HE 3rd, Ebner K, Tsankova NM, Carle TL, Ulery P, Bhonsle A, Barrot M, Krishnan V, Singewald GM, Singewald N, Birnbaum S, Neve RL and Nestler EJ (2007). Induction of deltaFosB in the periaqueductal gray by stress promotes active coping responses. *Neuron* 55: 289-300.
- Bessa JM, Morais M, Marques F, Pinto L, Palha JA, Almeida OF and Sousa N (2013). Stress-induced anhedonia is associated with hypertrophy of medium spiny neurons of the nucleus accumbens. *Transl Psychiatry* 3: e266.
- Bhatnagar S, Meaney MJ (1995). Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol* 7: 97-108.
- Bienvenu OJ, Davydow DS and Kendler KS (2011). Psychiatric 'diseases' versus behavioral disorders and degree of genetic influence. *Psychol Med* 41: 33-40.
- Bittencourt AS (2003). Função dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA nos comportamentos de defesa induzidos por estimulação de colunas distintas da matéria cinzenta periaquedutal e estruturas adjacentes. Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.
- Bittencourt AS, Carobrez AP, Zamprogno LP, Tufik S and Schenberg LC (2004). Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-methyl-D-aspartic acid glutamate receptors. *Neurosci* 125: 71-89.
- Blanchard DC and Blanchard RJ (1998). Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Ann Rev Psychol* 39: 43-68.

Blanchard DC, Cholvanich P, Blanchard RJ, Clow DW, Hammer Jr, Rowlett JK and Bardo MT (1991). Serotonin, but not dopamine, metabolites are increased in selected brain regions of subordinate male rats in a colony environment. *Brain Res* 568: 61-66.

Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ and Blanchard DC (1993). Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* 58: 155-165.

Blomstrand E, Perrett D, Parry-Billings M and Newsholme EA (1989). Effect of sustained exercise on plasma amino acid concentrations and on 5-hydroxytryptamine metabolism in six different brain regions of the rat. *Acta Physiol Scand* 136: 473-481.

Bobillier P, Pettijean F, Salvart D, Ligier M, Seguin S (1975). Differential projections of the nucleus Raphe dorsalis and nucleus Raphe centralis as revealed by autoradiography. *Brain Res* 85: 205-210.

Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM and Meaney MJ (1995). Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *The Journal Neurosci* 15: 61-69.

Boere V (2001). Environmental Enrichment for Neotropical Primates in Captivity. *Cienc Rural, Santa Maria* 31: 543-551.

Bonacchi KB, Ackroff K and Sclafani A (2008). Sucrose taste but not Polycose taste conditions flavor preferences in rats. *Physiol Behav* 95: 235-244.

Borges S, Coimbra B, Soares-Cunha C, Miguel Pêgo J, Sousa N and João Rodrigues A (2013). Dopaminergic modulation of affective and social deficits induced by prenatal glucocorticoid exposure. *Neuropsychopharm* 38: 2068-2079.

Bortoluzzi A (2012). Estudo de associação entre os transtornos de ansiedade e seus endótipos e o polimorfismo da região promotora do gene do transportador de serotonina (5-HTT) em adolescentes. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas. UFRGS, Porto Alegre.

Bourin M, Fiocco AJ and Clenet F (2001). How valuable are animal models in defining antidepressant activity? *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 16: 9-21.

Bowlby J (1983). Attachment and loss. 2nd Edition, New York: Basic Books.

Brhlikova P, Pollock AM and Manners R (2011). Global Burden of Disease estimates of depression-how reliable is the epidemiological evidence? *J R Soc Med* 104: 25-34.

Brodie BB and Shore PA (1957). A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann NY acad Sci* 66: 631-642.

Brodin E, Rosén A, Schött E and Brodin K (1994). Effects of sequential removal of rats from a group cage, and of individual housing of rats, on substance P, cholecystokinin and somatostatin levels in the periaqueductal grey and limbic regions. *Neuropept* 26: 253-260.

Brunton LL, Chabner BA and Knollman BC (2012). (Ed), Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 12 ed, New York: McGraw-Hill.

- Buckingham JC (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 147: S258-S268.
- Buynitsky T and Mostofsky DI (2009). Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33: 1089-1098.
- Cameron OG, Lee MA, Curtis GC and McCann DS (1987). Endocrine and physiological changes during "spontaneous" panic attacks. *Psychoneuroendocrinol* 12: 321-331.
- Cancela LM, Bregonzio C and Molina VA (1995). Anxiolytic-like effect induced by chronic stress is reversed by naloxone pretreatment. *Brain Res Bull* 36: 209-213.
- Canteras NS (2008). Neural systems activated in response to predators and partial predator stimuli. In: Blanchard DC, Blanchard RJ, Griebel G, Nutt D, editors. *Handbook of anxiety and fear*. Amsterdam: Academic Press; pp.124-140.
- Carobrez AP and Bertoglio LJ (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1193-1205.
- Carrasco GA, Van de Kar LD (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463: 235-272.
- Carrive P (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58: 27-47.
- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G and Artigas F (2001). Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.
- Cezário AF, Ribeiro-Barbosa ER, Baldo MVC and Canteras NS (2008). Hypothalamic sites responding to predator threats: the role of the dorsal premammillary nucleus in unconditioned and conditioned anti-predatory defensive behavior. *Eur J Neurosci* 28:1003-15.
- Chaouloff F (1997). Effects of acute physical exercise on central serotonergic systems. *Med Sci Sports Exerc* 29: 58-62.
- Chaouloff F, Elghozi JL, Guezennec Y and Laude D (1985). Effects of conditioned running on plasma, liver and brain tryptophan and on brain 5-hidroxytryptamine metabolism of the rat. *Br J Pharmacol* 86: 33-41.
- Chaouloff F, Kennett GA, Serrurier B, Merino D and Curzon G (1986). Amino acid analysis demonstrates that increased plasma free tryptophan causes the increase of brain tryptophan during exercise in the rat. *J Neurochem* 46: 1647-1650.
- Charney DS and Manji HK (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* 225: re5.
- Charney DS, Heninger GR and Breier A (1984). Noradrenergic function in panic anxiety. Effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 41: 751-763.

- Chrousos GP (2007). Organization and integration of the endocrine system. *Sleep Med Clin* 2: 125-145.
- Cohen ME and White PD (1951). Life situations, emotions and neurocirculatory asthenia (anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome). *Psychosom Med* 13: 335-357.
- conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 743-760.
- Conner RL, Vernikos-Danellis J and Levine S (1971). Stress, fighting and neuroendocrine function. *Nature* 234: 564-566.
- Conrad CD, Galea LA, Kuroda Y and McEwen BS (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behavioral Neuroscience* 110: 1321-1334.
- Consoli D, Fedotova J, Micale V, Saponov NS and Drago F (2005). Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced swim test). *Eur J Pharmacol* 520: 100-107.
- Cruz APM, Frei F and Graeff FG (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology, Biochem and Beh* 49: 171-176.
- Czéh B, Simon M, Schmelting B, Hiemke C and Fuchs E (2006). Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 31:1616-1626.
- D'Aquila PS, Newton J and Willner P (1997). Diurnal variation in the effect of chronic mild stress on sucrose intake and preference. *Physiol Behav* 62: 421-426.
- D'Aquila PS, Peana AT, Carboni V and Serra G (2000). Exploratory behavior and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine. *European Journal of Pharmacology* 399: 43-47.
- Dahlstrom A and Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. *Acta Psysiol Scand* 62: 1-55.
- Dallman MF, Akana SF, Cascio CS, Darlington DN, Jacobson L and Levin N (1987). Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res* 43: 113-173.
- Davidson MB and Echeverry D (2011). Collaborative care for depression and chronic illnesses. *N Engl J Med* 364:1278-1279.
- de Kloet ER (1995). Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol* 16: 416-425.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463-475.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS and Joëls M (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19: 269-301.
- Deakin JF and Graeff FG (1991). 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5: 305-315.

Di Chiara G and Tanda G (1997). Blunted reactivity of dopamine transmission to palatable food: a biochemical marker of anhedonia in the CMS model? *Psychopharmacol* 134: 351-353.

Dijkstra H, Tilders FJH, Hiehle MA and Smelik PG (1992). Hormonal reactions to fighting in rat colonies: prolactin rises during defense, not during offence. *Physiol Behav* 51: 961-968.

Dinan TG and Scott LV (2005). Anatomy of melancholia: focus on hypothalamic-pituitary-adrenal axis overactivity and the role of vasopressin. *J Anat* 207: 259-264.

Duman CH (2010). Models of depression. *Vitam Horm* 82: 1-21.

Einarsson S, Brandt Y, Lundeheim N and Madej A (2008). Stress and its influence on reproduction in pigs: a review. *Acta Vet Scand* 50: 48.

Emanuel RL, Thull DL, Girard DM and Majzoub JA (1989). Developmental expression of corticotropin releasing hormone messenger RNA and peptide in rat hypothalamus. *Peptides* 10: 1165-1169.

Epel ES (2009). Psychological and metabolic stress. A recipe for accelerated cellular aging? *Hormones* 8: 7-22.

Erhardt A, Ising M, Unschuld PG, Kern N, Lucae S, Pütz B, Uhr M, Binder EB, Holsboer F and Keck ME (2006). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system in patients with panic disorder. *Neuropsychopharmacology* 31: 2515-2522.

Erskine MS and Levine S (1973). Suppression of pituitary-adrenal activity and shock-induced fighting in rats. *Physiol Behav* 11: 787-790.

Fadda F (2000). Tryptophan-Free Diets: A Physiological Tool to Study Brain Serotonin Function. *News Physiol Sci* 15: 260-264.

Fendt, M., & Fanselow, M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of

Fernstrom JD and Wurtman RJ (1972). Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178: 414-416.

File SE (1988). How good is social interaction as a test of anxiety? In: P Simon, P Soubrie and D Wildlocher (Eds), *Selected models of anxiety, depression and psychosis*. Karger: Basle, pp. 151-166.

File SE (1996). Recent developments in anxiety, stress and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 3-12.

Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA and Bandler R (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 422: 556-578.

Flügge G (1995). Dynamics of central nervous 5HT_{1A}-receptors under psychosocial stress. *J Neurosci* 15: 7132-7140.

Flügge G (1996). Alterations in the central nervous Alpha 2-adrenoceptor system under chronic psychosocial stress. *Neurosci* 75: 187-196.

- Flügge G, Jöhren O and Fuchs E (1992). [3H]Rauwolscine binding sites in the brains of male tree shrews are related to social status. *Brain Res* 597: 131-137.
- Forbes NF, Stewart CA, Matthews K and Reid IC (1996). Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiology & Behavior* 60: 1481-1484.
- Fraser LM, Brown RE, Hussin A, Fontana M, Whittaker A, O'Leary TP, Lederle L, Holmes A and Ramos A (2010). Measuring anxiety-and locomotion-related behaviours in mice: a new way of using old tests. *Psychopharmacol* 211: 99-112.
- Frazer A and Hensler JG (1994). Serotonin. In *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 5th edition, pp 283-308, in Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB (eds). Raven Press, New York.
- Freedman RR, Ianni P, Ettedgui E and Puthezhath N (1985). Ambulatory monitoring of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 42: 244-248.
- Freud S (1896). On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as "anxiety neurosis". In: RM Hutchins (Editor-in-Chief), *Great Books of the Western World*, vol. 54, *Selected Papers on Hysteria*. Chicago: The Encyclopaedia Britannica, Inc., 1978, pp. 25-118.
- Froger N, Palazzo E, Boni C, Hanoun N, Saurini F, Joubert C, Dutriez-Casteloot I, Enache M, Maccari S, Barden N, Cohen-salmon C, Hamon M and Lanfumey L (2004). Neurochemical and behavioral alterations in glucocorticoid receptor-impaired transgenic mice after chronic mild stress. *J Neurosci* 24: 2787-2796.
- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P and Busby SJ (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492: 145-177.
- Galon J, Franchimont D, Hiroi N, Frey G, Boettner A, Ehrhart-Bornstein M, O'shea JJ, Chrousos GP and Bornstein SR (2002). Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *FASEB J* 16: 61-71.
- Gamaro GD (1998). *Estresse crônico variável: estudo de alguns parâmetros bioquímicos e comportamentais*. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas. UFRGS, Porto Alegre.
- Gamaro GD, Manoli LP, Torres IL, Silveira R and Dalmaz C (2003). Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain strutures. *Neurochem Int* 42: 107-114.
- Gambarana C, Masi F, Leggio B, Grappi S, Nanni G, Scheggi S, De Montis MG and Tagliamonte A (2003). Acquisition of a palatable-food-sustained appetitive behavior in a satiated rats is dependent on the dopaminergic response to this food in limbic areas. *Neurosci* 121: 179-187.
- Garcia-Marquez C and Armario A (1987). Chronic stress depresses exploratory activity and behavioral performance in the forced swimming test without altering ACTH response to a novel acute stressor. *Physiol Behav* 40: 33-38.

- Garnezy N (1991). Resiliency and vulnerability to adverse developmental outcomes associated with poverty. *American Behavioral Scientist* 34: 416-430.
- Gentil V (1988). The aversive System, 5-HT and panic attacks. In: P Simon, P Soubrié and D Wildlocher (Eds), *Animal Models of Psychiatric Disorders*. Karger: Basel, pp. 142-145.
- Gesing A, Bilang-bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F and Reul JM (2001). Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 21: 4822-4829.
- Giza BK, Scott TR, Sclafani A and Antonucci RF (1991). Polysaccharides as taste stimuli: their effect in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Brain Res* 555: 1-9.
- Goetz RR, Klein DF and Gorman JM (1994). Consistencies between recalled panic and lactate-induced panic. *Anxiety* 1: 31-36.
- Golan DE, Tashjian AH Jr, Armstrong EJ and Armstrong AW (2009). *Princípios de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia*. Guanabara Koogan, 2ª edição.
- Goldstein DS (2010). Adrenal Responses to Stress. *Cell Mol Neurobiol* 30: 1433-1440.
- Goltz F (1892). Der Hund ohne Grosshirn. *Pflügers Arch Ges Physiol* 51: 570-614.
- Gotlib IH, Joormann J (2010). Cognition and depression: current status and future directions. *Annu Rev Clin Psychol* 6: 285-312.
- Grace L, Heschem S, Kellaway LA, Bugarith K and Russell VA (2009). Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. *Metab Brain Dis* 24: 643-657.
- Graeff FG (2003). Serotonina, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Rev Bras Psiquiatr* 25: 42-45.
- Graeff FG (2012). New perspective on the pathophysiology of panic: merging serotonin and opioids in the periaqueductal gray. *Braz J Med Biol Res* 45: 366-375.
- Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM and Guimarães FS (2005). Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *An Acad Bras Cienc* 77: 477-491.
- Graeff FG, Viana MB and Tomaz C (1993). The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26: 67-70.
- Gray JA (1991). *The psychology of fear and stress*. Cambridge: Cambridge University Press, 2Ed.
- Gronli J, Bramham C, Murison R, Kanhema T, Fiske E, Bjorvatn B, Ursin R and Portas CM (2006). Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in the dentate gyrus but not in the hippocampus proper. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 842-849.

- Guimarães FS (2000). Medicamentos antidepressivos e estabilizadores do humor. In: Graeff FG e Guimarães FS. Fundamentos de psicofarmacologia. São Paulo: Editora Atheneu, pp. 93-122.
- Guyton AC and Hall JE (2006). Tratado de Fisiologia Médica. 11ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed.
- Haddley K, Bubb VJ, Breen G and Quinn JP (2012). Behavioural Genetics of the Serotonin Transporter. *Curr Topics Behav Neurosci*.
- Hammack SE, Cooper MA and Lezak KR (2012). Overlapping neurobiology of learned helplessness and conditioned defeat: implications for PTSD and mood disorders. *Neuropharmacology* 62: 565-575.
- Haring JH (1991). Reorganization of the area dentata serotonergic plexus after lesions of the median raphe nucleus. *J Comp Neural* 306: 576-584.
- Harris RB, Mitchell TD, Simpson J, Redmann SM Jr, Youngblood BD and Ryan DH (2002). Weight loss in rats exposed to repeated acute restraint stress is independent of energy or leptin status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282: R77-R88.
- Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Smagin GN and Ryan DH (1998). Failure to change exploration or saccharin preference in rats exposed to chronic mild stress. *Physiol Behav* 63: 91-100.
- Harvey PO, Le Bastard G, Pochon JB, Levy R, Allilaire JF, Dubois B and Fossati P (2004). Executive functions and updating of the contents of working memory in unipolar depression. *J Psychiatr Res* 38: 567-576.
- Hatzinger M (2000). Neuropeptides and hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) system: review of recent research strategies in depression. *World J Biol Psychiatry* 1: 105-111.
- Hayden-Hixon DM and Nemeroff CB (1993). Role(s) of neuropeptides in responding and adaptation to stress: a focus on corticotrofin-releasing factor and opioid peptides. In: Stanford SC and Salmon P (eds). *Stress: From synapse to syndrome*. London: Academic Press. pp. 356-391.
- Heilbronner U, van Kampen M and Flügge G (2004). The Alpha-2B adrenoceptor in the paraventricular thalamic nucleus is persistently upregulated by chronic psychosocial stress. *Cell Mol Neurobiol* 24: 815-831.
- Helmstetter FJ (1992). Contribution of the amygdala to learning and performance of conditional fear. *Physiol Behav* 51: 1271-1276.
- Henn FA and Vollmayr B (2005). Stress models of depression: forming genetically vulnerable strains. *Neurosci and Biobehav Rev* 29: 799-804.
- Henningsen K, Dyrvig M, Bouzinova EV, Christiansen S, Christensen T, Andreasen JT, Palme R, Lichota J and Wiborg O (2012). Low maternal care exacerbates adult stress susceptibility in the chronic mild stress rat model of depression. *Behav Pharmacol* 23: 735-43.

- Henningsen K, Woldbye DPD and Wiborg O (2013). Electroconvulsive stimulation reverses anhedonia and cognitive impairments in rats exposed to chronic mild stress. *Eur Neuropsychopharmacol* 23: 1789-1794.
- Hihn H, Baune BT, Michael N, Markowitsch H, Arolt V and Pfeleiderer B (2006). Memory performance in severely depressed patients treated by electroconvulsive therapy. *J ECT* 22: 189-195.
- Hollander E, Liebowitz MR, Cohen B, Gorman JM, Fyer AJ, Papp LA and Klein DF (1989). Prolactin and sodium lactate-induced panic. *Psychiatry Res* 28: 181-191.
- Hoyer D, Hannon JP and Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 533-554.
- Hunsperger RW (1956). Affektreaktionen auf elektrische Reizung im Hirnstamm der Katze. *Helv Physiol Acta* 14: 70-92.
- Inoue M, Glendinning JI, Theodorides ML, Harkness S, Li X, Bosak N, Beauchamp GK and Backmanov AA (2007). Allelic variation of the *Tas1r3* taste receptor gene selectively affects taste responses to sweeteners: evidence from 129.B6-*Tas1r3* congenic mice. *Physiol Genomics* 32: 82-94.
- Jacobs BL and Azmitia EC (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165-229.
- Jankowski MP and Sesack SR (2004). Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 468: 518-529.
- Jenck F, Moreau JL and Martin JR (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Res* 57: 181-191.
- Johnson MR and Lydiard RB (1998). Comorbidity of major depression and panic disorder. *J Clin Psychol* 54: 201-210.
- Johnson P, Lowry C, Truitt W and Shekhar A (2008). Disruption of GABAergic tone in the dorsomedial hypothalamus attenuates responses in a subset of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus following lactate-induced panic. *J Psychopharmacol* 22: 642-652.
- Johnson PL, Hollis JH, Moratalla R, Lightman SL and Lowry CA (2005). Acute hypercarbic gas exposure reveals functionally distinct subpopulations of serotonergic neurons in rats. *J Psychopharmacol* 19: 327-341.
- Katz RJ (1982). Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol Biochem Behav* 16: 965-968.
- Katz RJ and Schmaltz K (1980). Dopaminergic involvement in attention a novel animal model. *Prog Neuropsychopharmacol* 4: 585-590.
- Katz RJ, Roth KA, Schmaltz K (1981). Amphetamine and tranlylcypromine in an animal model of depression: pharmacological specificity of the reversal effect. *Neurosci Biobehav Rev* 5: 259-264.

- Kaufman J and Charney D (2000). Comorbidity of mood and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12: 69-76.
- Kellner M, Knaudt K, Jahn H, Holsboer F and Wiedemann K (1998). Atrial natriuretic hormone in lactate-induced panic attacks: mode of release and endocrine and pathophysiological consequences. *J Psychiatr Res* 32: 37-48.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156: 837-841.
- Kendler KS, Kessler RC, Walters EE, Maclean C, Nela MC, Hesth AC and Eaves LJ (1995). Stressful life events, genetic liability, and onset of an episode of major depression in women. *Am J Psychiatr* 6: 833-42.
- Kennedy SH (2008). Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. *Dialogues Clin Neurosci* 10: 271-277.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR and Walters EE (2005). Prevalence, severity and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the national comorbidity survey replication. *Arch Gen Psychiatry* 62: 617-627.
- Kim JJ and Diamond DM (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3: 453-462.
- Kitraki E, Karandrea D and Kittas C (1999). Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinol* 69: 331-338.
- Klauke B, Deckert J, Reif A, Pauli P and Domschke K (2010). Life events in panic disorder - an update on "candidate stressors". *Depress Anxiety* 27: 716-730.
- Klein DF (1993). False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry* 50: 306-317.
- Koenen KC, Lyons MJ, Goldberg J, Simpson J, Williams WM, Toomey R, Eisen SA, True WR, Cloitre M, Wolfe J and Tsuang MT (2003). A high risk twin study of combat-related PTSD comorbidity. *Twin Res* 6: 218-226.
- Konkle ATM, Baker SL, Kentne AC, Barbagallo LSM, Merali Z and Bielajew C (2003). Evaluation of the effects of chronic mild stressors on hedonic and physiological responses. *Brain Res* 992: 227-238.
- Kopin IJ (1995). Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Ann N Y Acad Sci* 771: 19-30.
- Kosofsky BE and Molliver ME (1987). The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1: 153-168.
- Krishnan V and Nestler EJ (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 455: 894-902.
- Kruk ZL and Pycock CJ (1991). *Neurotransmitters and Drugs*, London: Chapman & Hall, 1991, 204p.

Krulich L, Hefco E, Illner P and Read CB (1974). The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology* 16: 293-311.

Lachuer J, Delton I, Buda M and Tappaz M (1994). The habituation of brainstem catecholaminergic groups to chronic daily restraint stress specific like that of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Res* 638: 196-202.

Lecrubier Y (1998). The impact of comorbidity on the treatment of panic disorder. *J Clin Psychiatry* 59: 11-14.

Leonard BE, Earley CJ and Egan J (1979). Neurochemical and behavioural aspects of olfactory bulbectomy in the rat. *Biol Aspects Learn* 5: 153-162.

Lesch KP (2001). Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 457-474.

Levin AP, Doran AR, Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Klein DF and Paul SM (1987). Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Psychiatry Res* 21: 23-32.

Levine S (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Ann N Y Acad Sci* 746: 275-288.

Levine S (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiol Behav* 73: 255-260.

Levine S (2002). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotox Res* 4: 557-564.

Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P and Tang Y (2008). Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci* 82: 934-942.

Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, Apfleby IL, Anderson S, Palij M and Davies SO (1985). Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiatry* 42: 709-719.

Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM and Monteggia LM (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci* 25: 3091-3098.

López JF, AKIL H and Watson SJ (1999). Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiatry* 46: 1461-1471.

Lucca G, Comim CM, Valvassori SS, Pereira JG, Stertz L Gavioli EC, Kapczinski F and Quevedo J (2008). Chronic mild stress paradigm reduces sweet food intake in rats without affecting brain derived neurotrophic factor protein levels. *Curr Neurovasc Res* 5: 207-213.

Lucinda AM (2006). Modulação noradrenérgica do núcleo mediano da rafe: implicações sobre o comportamento defensivo de ratos no labirinto em cruz elevado. Dissertação de mestrado em Neurociências. UFSC, Florianópolis.

- Luo XM, Yuan SN, Guan XT, Xie X, Shao F and Wang WW (2014). Juvenile stress affects anxiety-like behavior and limbic monoamines in adult rats. *Physiol Behav* 135C: 7-16.
- Lupien SJ and Meaney MJ (1998). Stress, glucocorticoids, and hippocampal aging in rat and human. In: Wang E. and Snyder DS (eds). *Handbook of the Aging Brain*. Academic Press Ltd., Chap. 1, pp. 1-19.
- Maier SF (1984). Learned helplessness and animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 8: 435-446.
- Maier SF and Watkins LR (2005). Stressor controllability and learned helplessness: The roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 829-841.
- Maier SF and Watkins LR (2010). Role of the medial prefrontal cortex in coping and resilience. *Brain Res* 1355: 52-60.
- Maier SF, Amat J, Baratta MV, Paul E and Watkins LR (2006). Behavioral control, the medial prefrontal cortex, and resilience. *Dialogues Clin Neurosci* 8: 397-406.
- Manoli LP, Gamaro GD, Silveira PP and Dalmaz C (2000). Effect of chronic variate stress on thiobarbituric-acid reactive species and on total radical-trapping potential in distinct regions of rat brain. *Neurochem Res* 25: 915-921.
- Marais L, Hattingh SM, Stein DJ and Daniels WM (2009). A proteomic analysis of the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation and escitalopram treatment. *Metab Brain Dis* 24:569-586.
- Maron E, Kuikka JT, Shlik J, Vasar V, Vanninen E and Tiihonen J (2004). Reduced brain serotonin transporter binding in patients with panic disorder. *Psych Res* 132: 173-181.
- Marques N and Menna-Barreto L (1997). *Cronobiologia. Princípios e aplicações*. São Paulo: Edusp – Editora Fiocruz.
- Martinowich K and Lu B (2008). Interaction between BDNF and Serotonin: Role in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacol* 33: 73-83.
- Mason JW (1971). A re-evaluation of the concept of “non-specificity” in stress theory. *J Psychiatr Res* 8: 323-333.
- Matthews K, Forbes N and Reid IC (1995). Sucrose consumption as a hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiol Behav* 57: 241-248.
- Mattson MP, Maudsley S and Martin B (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trend Neurosci* 27: 589-594.
- McEwen BS (1991). Steroid hormones are multifunctional messengers to the brain. *Trends Endocrinol Metab* 2: 62-67.
- McEwen BS (1998). Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 33: 171-179.

McEwen BS (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886: 172-189.

McEwen BS and Magarinos AM (1997). Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 821: 271-284.

McEwen BS and Wingfield JC (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43: 2-15.

Meijer OC, Van Oosten RV and de Kloet ER (1997). Elevated basal trough levels of corticosterone suppress hippocampal 5-hydroxytryptamine(1A) receptor expression in adrenalectomized rats: implication for the pathogenesis of depression. *Neurosci* 80: 419-426.

Mioduszecki R and Critchlow V (1982). Forebrain structures which mediate the effects of stress on prolactin and growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 110: 1972-1976.

Mistlberger RE and Antle MC (1998). Behavioral inhibition of light-induced circadian phase resetting is phase and serotonin dependent. *Brain Res* 786: 31-38.

Mitchell ND and Baker GB (2010). An update on the role of glutamate in the pathophysiology of depression. *Acta Psychiatr Scand* 122: 192-210.

Miyagawa K, Tsuji M, Ishii D, Takeda K and Takeda H (2014). Prenatal stress induces vulnerability to stress together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Behav Brain Res* S0166-4328(14)00288-5.

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH and Tabira T (2001). Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinol* 26: 443-459.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L and Gwaltney-Brant SM (2008). Serotonin: a review. *J vet Pharmacol Therap* 31: 187-199.

Morin LP (1992). Serotonergic reinnervation of the hamster suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet without functional circadian rhythm recovery. *Brain Res* 599: 98-104.

Muscat R, Papp M and Willner P (1992). Reversal of stress-induced anhedonia by the atypical antidepressants, fluoxetine and maprotiline. *Psychopharmacol*, 109, 433-438.

Nashold BS Jr, Wilson WP and Slaughter DG (1969). Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30: 14-24.

Neill JD (1970). Effects of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 87: 1192-1197.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ and Monteggia LM (2002). Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25.

Neumeister A, Bain E, Nugent AC, Carson RE, Bonne O, Luckenbaugh DA, Eckelman W, Herscovitch P, Charney DS and Drevets WC (2004). Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. *J Neurosci* 24: 589-591.

- Newsholme EA, Acworth I and Blomstrand E (1987). Amino-acids, brain neurotransmitters and a functional link between muscle and brain that is important in sustained exercise. In: G. Benzi (Ed.), *Advances in Biochemistry*, John Libbey Eurotext Ltd, London, 127-133.
- Nielsen CK, Arnst J and Sánchez C (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behav Brain Res* 107: 21-33.
- Nishi M and Azmitia EC (1996). 5HT_{1A} receptor expression is modulated by corticosteroid receptor agonists in primary rat hippocampal culture. *Brain Res* 722: 190-194.
- Nishimura J, Endo Y, Kimura F (1999). A long term stress exposure impairs maze learning performance in rats. *Neurosci Lett* 273: 125-128.
- Nixon RD and Bryant RA (2003). Peritraumatic and persistent panic attacks in acute stress disorder. *Behav Res Ther* 41: 1237-1242.
- Oliveira-Silva IF, Pinto L, Pereira SRC, Ferraz VP, Barbosa AJA, Coelho VAA, Gualberto FFAS, Souza VF, Faleiro RRM, Franco GC and Ribeiro AM (2007). Age-related deficit in behavioural extinction is counteracted by long-term ethanol consumption: correlation between 5-HIAA/5HT ratio in dorsal raphe nucleus and cognitive parameters. *Behav Brain Res* 180: 226-234.
- Ordquist N and Orelund L (2010). Serotonin, genetic variability, behaviour, and psychiatric disorders - a review. *Upsala j Med Sci* 115: 2-10.
- Otte C, Kellner M, Arlt J, Jahn H, Holsboer F, Wiedemann K (2002) Prolactin but not ACTH increases during sodium lactate-induced panic attacks. *Psychiatry Res* 109: 201-205.
- Pacák K and Palkovits M (2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22: 502-548.
- Pacak K, Palkovits M, Yadid G, Kvetnansky R, Kopin IJ and Goldstein DS (1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275: R1247-R1255.
- Padovan CM, Del Bel EA, Guimarães FS (2000). Behavioral effects in the elevated plus maze of an NMDA antagonist injected into the dorsal hippocampus: influence of restraint stress. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 325-330.
- Papp M, Klimek V and Willner P (1994). Effects of imipramine on serotonergic and beta-adrenergic receptor binding in a realistic animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 114: 309-14.
- Parker KJ, Schatzberg AF and Lyons DM (2003). Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav* 43: 60-66.
- Parvizi J, Van Hoesen GW and Damasio A (2000). Selective pathological changes of the periaqueductal gray matter in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 48: 344-353.

- Paxinos G and Watson C (2005). The rat brain in stereotaxic coordinates. Amsterdam: Academic Press.
- Paykel ES (2001). Stress and affective disorders in humans. *Semin Clin Neuropsychiatry* 6: 4-11.
- Perez C and Sclafani A (1990). Developmental changes in sugar and starch taste preferences in young rats. *Physiol Behav* 48: 7-12.
- Peroutka S and Howell T (1994). The molecular evolution of G protein-coupled receptors. *Neuropharmacol* 33: 319-324.
- Pestana FM (2010). Avaliação comportamental e dos níveis séricos e metabolismo periférico dos hormônios tireoidianos em ratos submetidos ao estresse social seriado. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária. UFRRJ, Seropédica.
- Peters A and McEwen BS (2012). Introduction for the allostatic load special issue. *Physiol Behav* 106: 1-4.
- Pijlman FT, Wolterink G and Van Ree JM (2003). Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behavior in rats. *Behav Brain Research* 139: 131-138.
- Pinato L, Ferreira ZS, Markus RP and Nogueira MI (2004). Bimodal daily variation in the serotonin content in the raphe nuclei of rats. *Biol Rhythm Res* 35: 245-257.
- Pinheiro DPN (2004). A resiliência em discussão. *Psicologia em Estudo, Maringá* 9: 67-75.
- Pitts FN and McClure JN (1967). Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med* 277: 1329-1336.
- Pobbe RLH and Zangrossi H Jr (2005). 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat dorsal periaqueductal gray mediate the antipanic-like effect induced by the stimulation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Psychopharmacol* 183: 314-321.
- Porsolt RD, Le Pichon M and Jalfre M (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266: 730-732.
- Post RM (1992). Transduction of psychosocial stress into the neurobiology of recurrent affective disorder. *Am J Psychiatr* 8: 999-1010.
- Pryce CR, Azzinnari D, Spinelli S, Seifritz E, Tegethoff M and Meinschmidt G. (2011) Helplessness: A systemic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression. *Pharmacol Ther* 132: 242-267.
- Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH and Janowsky DS (1993). Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *Physiol Behav* 54: 1215-1220.
- Puglisi-Allegra S, Kempf E, Schlee C and Cabib S (1991). Repeated stressful experiences differently affect brain dopamine receptor subtypes. *Life Sci* 48: 1263-1268.

Quintino-dos-Santos JW (2011). Determinantes biológicos da comorbidade dos ataques de pânico com depressão e ansiedade de separação. Tese de doutorado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.

Quintino-dos-santos JW, Müller CJT, Santos AMC, Tufik S, Rosa CA and Schenberg LC (2013). Long-lasting marked inhibition of periaqueductal gray-evoked defensive behaviors in inescapably-shocked rats. *Eur J Neurosci* 39: 275-286.

Ramos A, Berton O, Mormède P and Chaouloff F (1997). A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 85: 57-69.

Ramos A, Mellerin Y, Mormede P and Chaouloff F (1998). A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav Brain Res* 96: 195-205.

Ramos A and Mormède P (1998). Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach *Neurosci Biobehav Rev* 22: 33-57.

Ramos V, Biesdorf C, Henrique D, Zangrossi H, Guilherme F and Aparecida E (2011). Serotonin-1A receptors in the dorsal periaqueductal gray matter mediate the panicolytic-like effect of pindolol and paroxetine combination in the elevated T-maze. *Neurosci Lett* 495: 63-66.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM and Moore PK (2003). *Farmacologia*. São Paulo: Elsevier Editora.

Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL and Hackman KA (1989). Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiatry* 46: 493-500.

Reul JM, Pearce PT, Funder JW, Krozowski ZS (1989). Type I and type II corticosteroid receptor gene expression in the rat: effect of adrenalectomy and dexamethasone administration. *Mol Endocrinol* 3: 1674-1680.

Robinson TE, Berridge KC (2000). The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95: S91-S117.

Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA and Riva MA (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol Psychiatry* 7: 609-616.

Rodrigues SM, LeDoux JE and Sapolsky RM (2009). The influence of stress hormones on fear circuitry. *Annu Rev Neurosci* 32: 289-313.

Roncon CM, Biesdorf C, Santana RG, Zangrossi H, Graeff FG and Audi EA (2012). The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. *J Psychopharmacol* 26: 525-531.

Rosa CA (2012). Efeitos tardios do isolamento social neonatal e do desamparo aprendido sobre os níveis tissulares e taxa de renovação da serotonina das regiões dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal de ratos. Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.

Rosa CA (2012). Efeitos tardios do isolamento social neonatal e do desamparo aprendido sobre os níveis tissulares e taxa de renovação da serotonina das regiões dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaquedutal de ratos. Dissertação de mestrado em Ciências Fisiológicas. UFES, Vitória.

Rosén A, Brodin K, Eneroth P and Brodin E (1992). Short-term restraint stress and s.c. saline injection alter the tissue levels of substance P and cholecystokinin in the periaqueductal gray and limbic regions of rat brain. *Acta Physiol Scand* 3: 341-348.

Rueter LE and Jacobs BL (1996). Changes in forebrain serotonin at the light-dark transition: correlation with behaviour. *Neuroreport* 7: 1107-1111.

Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, de Felipe C, Hunt S and Wheeldon A (2000). Pharmacological blockade or genetic deletion of Substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalization in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacol* 39: 1413-1421.

Safadi G and Bradwejn J (1995). Relationship of panic disorder to posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiat* 52: 76-78.

Sako N, Shimura T, Komure M, Mochizuki R, Matsuo R and Yamamoto T (1994). Differences in taste responses to Polycose and common sugars in the rat as revealed by behavioral and electrophysiological studies. *Physiol Behav* 56: 741-745.

Sapolsky RM (1992). Neuroendocrinology of the stress-response. In: Becker JB, Breedlove SM, Crews D, editors. *Behavioral endocrinology*. Cambridge, MA: MIT Press 287-324.

Sapolsky RM (2003). Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res*. 28: 1735-1742.

Schapiro S, Geller E and Eiduson S (1992). Neonatal adrenal cortical response to stress and vasopressin. *Proc Soc Exp Biol Med* 109: 937-941.

Schellinck HM, Cyr DP and Brown RE (2010). How many ways can mouse behavioral experiments go wrong? Confounding variables in mouse models of neurodegenerative diseases and how to control them., *Advances in the Study of Behavior*, 41, 255-366.

Schenberg LC (2010). Towards a translational model of panic attack. *Psychol Neurosci* 3: 9-37.

Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré EC and Vargas LC (2001). Modeling panic attacks. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 647-659.

Schenberg LC, Dos Reis AM, Ferreira Pova RM, Tufik S and Silva SR (2008). A panic attack-like unusual stress reaction. *Horm Behav* 54: 584-591.

Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa ALP, Caldellas AV, Tufik S and Bittencourt AS (2005). Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1279-1298.

Schenberg LC, Vasquez EC and Costa MB (1993). Cardiac baroreflex dynamics during the defence reaction. *Brain Res* 621: 50-58.

- Schimitel FG, de Almeida GM, Pitol DN, Armini RS, Tufik S and Schenberg LC (2012). Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neurosci* 200: 59-73.
- Schultz W (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36: 241-263.
- Sclafani A, Zukerman S, Glendinning JI and Margolskee RF (2007). Fat and carbohydrate preferences in mice: the contribution of a-gustducin and Trpm5 taste signaling proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1504-1513.
- Scopes RK (1974). Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem* 59: 277-282.
- Scribner KA, Walker CD, Cascio CS and Dallman MF (1991). Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology* 129: 99-108.
- Seckl JR and Fink G (1992). Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo. *Neuroendocrinol* 55: 621-626.
- Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.
- Selye H (1956). *Stress and Disease*. New York: McGraw-Hill.
- Selye H (1973). Homeostasis and heterostasis. *Perspectives in Biology and Medicine* 16: 1-5.
- Selye H (1974). *Stress Without Distress*. New York: New York American Library.
- Selye H, Fortier C (1949). Adaptative reactions to stress. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 29: 3-18.
- Shelton RC (2007). The molecular neurobiology of depression. *Psychiatr Clin North Am* 30: 1-11.
- Shikanai H, Kimura S and Togashi H (2013). Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation. *Biol Pharm Bull* 36: 1392-1395.
- Shikanai H, Kimura S and Togashi H (2013). Early Life Stress Affects the Serotonergic System Underlying Emotional Regulation. *Biol Pharm Bull* 36: 1392-1395.
- Siegel RA, Conforti N and Chowdhury I (1980). Neural pathways mediating the prolactin secretory response to acute neurogenic stress in the male rat. *Brain Res* 198: 43-53.
- Silva TS, Bernabé CS, Armini RS and Schenberg LC (2012). Sensibilização ao novo ataque de pânico e eliciação do controle inibitório de ratos expostos à estimulação elétrica aversiva crônica da matéria cinzenta periaquedutal pela análise de limiares das respostas de defesa. *Rev Med Minas Gerais* 22: S94.
- Siuciak JA, Clark MS, Rind HB, Whittemore SR and Russo AF (1998) BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci Res* 52: 149-158.
- Soares DD, Coimbra CC and Marubayashi U (2007). *Neurosci Lett* 415: 274-278.

Soares DD, Lima NRV, Coimbra CC and Marub Ayashi U (2003). Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74: 357-362.

Soares DD, Lima NRV, Coimbra CC and Marub Ayashi U (2004). Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats. *Pharmacol Biochem Behav* 78: 255-261.

Soares VP and Zangrossi H Jr (2009). Stimulation of 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A} receptors in the ventrolateral periaqueductal gray causes anxiolytic-, but not panicolytic-like effect in rats. *Behav Brain Res* 197: 178-85.

Southwick SM, Bremner JD, Rasmusson A, Morgan CA III, Arnsten A and Charney DS (1999). Role norepinephrine in pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder. *Biological psychiatry* 46: 1192-1204.

Steenbergen HL, Heinsbroek RP, Van Hest A, Van de Poll NE (1990). Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. *Physiol Behav* 48: 571-576.

Stein MB, Tancer ME and Uhde TW (1992). Heart rate and plasma norepinephrine responsivity to orthostatic challenge in anxiety disorders. Comparisons of patients with panic disorder and social phobia and normal control subjects. *Arch Gen Psychiatry* 49: 311-317.

Stratakis CA and Chrousos GP (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann NY Acad Sci* 771: 1-18.

Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P and Levine S (1993). Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinol* 57: 204-212.

Suchecki D, Rosenfeld P and Levine S (1993). Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Res Dev Brain Res* 75: 185-192.

Sudré EC, de Barros MR, Sudré GN and Schenberg LC (1993). Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav Brain Res* 58: 141-154.

Sullivan PF, Neale MC and Kendler KS (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* (157): 1552-1562.

Sundström E, Kölare S, Souverbie F, Samuelsson EB, Pschera H, Lunell NO and Seiger A (1993). Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Res Dev Brain Res* 75: 1-12.

Tan H, Zhong P and Yan Z (2004). Corticotropin-releasing factor and acute stress prolongs serotonergic regulation of GABA transmission in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 24: 5000-5008.

Tang M, Lei J, Sun X, Liu G and Zhao S (2013). Stress-induced anhedonia correlates with lower hippocampal serotonin transporter protein expression. *Brain Re* 1513: 127-134.

Thomaz CRC (2001). Efeitos da submissão ao chronic mild stress sobre o valor reforçador do estímulo. Dissertação de mestrado em Psicologia experimental. PUC-SP, São Paulo.

Thomaz CRDC (2009). Possíveis inter-relações entre a submissão ao chronic mild stress (CMS) e o desempenho operante. Tese de doutorado em Psicologia. USP, São Paulo.

Törk J and Hornung JP (1990). Raphe nuclei and serotonin containing systems. Em: Paxinos, G. (ed). The Human Nervous System. San Diego, CA. Academic Press. pp 1001-1022.

Torres ILS, Gamaro GD, Silveira-Cucco SN, Michalowski MB, Corrêa JB, Perry MLS and Dalmaz C (2001). Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. *Braz J Med Biol Res* 34: 111-116.

Travers SP and Norgren R (1991). Coding the sweet taste in the Nucleus of the Solitary Tract: differential roles for anterior tongue and nasoincisor duct gustatory receptors in the rat. *J Neurophysiol* 65: 1372-1380.

Treit D, Menard J and Royan C (1993). Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 44: 463-469.

Tsigos C and Chrousos GP (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosomatic Res* 53: 865-871.

Uebelacker LA, Keitner GB, Ryan CE, Miller IW (2004). Characterizing the long-term course of individuals with major depressive disorder. *J Nerv Ment Dis* 192: 65-68.

Ulrich-Lai YM and Herman JP (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10: 397-409.

Unger T, Carolus S, Demmert G, ganten D, Lang RE, Maser-Gluth C, Steinberg H and Veelken R (1988). Substance P induces a cardiovascular defense reaction in the rat: pharmacological characterization. *Circ Res* 4: 812-820.

Vargas LC, Marques TA and Schenberg LC (2000). Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. *Neurosci Lett* 280: 45-48.

Vega-Rivera NM, Fernández-Guasti A, Ramírez-Rodríguez G, Estrada-Camarena E (2014). Forced swim and chronic variable stress reduced hippocampal cell survival in OVX female rats. *Behav Brain Res* 270C: 248-255.

Viana MB, Tomaz C and Graeff FG (1994). The Elevated T-Maze : A new Animal Model of Anxiety and Memory. *Pharmacol Biochem Behav* 49: 549-554.

Vigorito M and Sclafani A (1988). Ontogeny of Polycose and sucrose appetite in neonatal rats. *Dev Psychobiol* 21: 457-465.

Villela DC, da Silva LG Jr and Fontes MA (2009). Activation of 5-HT receptors in the periaqueductal gray attenuates the tachycardia evoked from dorsomedial hypothalamus. *Auton Neurosci* 148: 36-43.

Walker CD, Sapolsky RM, Meaney MJ, Vale WW and Rivier CL (1986). Increased pituitary sensitivity to glucocorticoid feedback during the stress nonresponsive period in the neonatal rat. *Endocrinol* 119: 1816-1821.

Weiberg MS, Bhatt AP, Girotti M, Masini CV, Day HE, Campeau S and Spencer RL (2009). Repeated ferret odor exposure induces different temporal patterns of same-stressor habituation and novel-stressor sensitization in both hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and forebrain c-fos expression in the rat. *Endocrinol* 150: 749-761.

Whithall MH, Kiss A and Aguilera G (1993). Contrasting effects of central alpha-1-adrenoreceptor activation on stress-responsive and stress-nonresponsive subpopulations of corticotropin-releasing hormone neurosecretory cells in the rat. *Neuroendocrinol* 58: 42-48.

Willner P (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacol* 83: 1-16.

Willner P (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacol* 134: 319-329.

Willner P (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiol* 52: 90-110.

Willner P and Papp M (1997). Animal models to detect antidepressants: are new strategies necessary to detect new agent? In: P Skolnick (Ed.), *Antidepressants: current trends and future directions*. New York: The Humana Press Inc.

Willner P, Moreau JM, Nielsen C, Papp M and Sluzewska (1996). Decreased hedonic responsiveness following chronic mild stress is not secondary to loss of body weight. *Physiol Behav* 60: 129-134.

Willner P, Muscat R and Papp M (1992). Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia: A Realistic Animal Model of Depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 525-534.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S and Muscat R (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacol (Berl)* 93: 358-64.

Wise CD, Berger BD, Stein L (1972). Benzodiazepines: anxiety-reducing activity by reduction of serotonin turnover in the brain. *Sci* 177: 180-183.

Wise RA (2002). Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36: 229-240.

Woods SW, Charney DS, Goodman WK and Henninger GR (1987a) Carbon dioxide-induced anxiety: behavioral, physiologic and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorder and healthy subjects. *Arch Gen Psychiat* 45: 43-52.

Woods SW, Charney DS, McPherson CA, Gradman AH and Heninger GR (1987b). Situational panic attacks. Behavioral, physiologic, and biochemical characterization. *Arch Gen Psychiatry* 44: 365-375.

Wright JS and Panksepp J (2011). Toward affective circuit-based preclinical models of depression: sensitizing dorsal PAG arousal leads to sustained suppression of positive affect in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 1902-1915.

Young RF and Rinaldi PC (1997). Brain stimulation. In: North, R.B., Levy, R.M. (Eds.), *Neurosurgical Management of Pain*. Springer, New York, pp. 288–290.

Zangrossi HJ and Graeff FG (1997). Behavioral validation of the elevated Tmaze, a new animal model of anxiety. *Brain Res Bull* 44: 1-5.

Zanoveli JM, Pobbe RL, de Bortoli VC, Carvalho MC, Brandão ML and Zangrossi HJr (2010). Facilitation of 5-HT_{1A}-mediated neurotransmission in dorsal periaqueductal grey matter accounts for the panicolytic-like effect of chronic fluoxetine. *Int J Neuropsychopharmacol* 13: 1079-1088.

Zatz M and Herkenham MA (1981). Intraventricular carbachol mimics the phase-shifting effect of light on the circadian rhythm of wheel-running activity. *Brain Res* 212: 234-238.

Zhou J, Li L, Tang S, Cao X, Li Z, Li W, Li C and Zhang X (2008). Effects of serotonin depletion on the hippocampal GR/MR and BDNF expression during the stress adaptation. *Behav Brain Res* 195: 129-138.

Zurita A, Martijena I, Cuadra G, Brandão ML and Molina V (2000). Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: reversal by naltrexone pretreatment. *Behav Brain Res* 117: 163-171.

APÊNDICES

APÊNDICE A

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

ÁCIDO PERCLÓRICO 0,1M

1. Misturar 86 μL de HClO_4 70 % em água ultrapura q.s.p. 100 mL.

1.1. Recomenda-se um volume maior se também for preparar as soluções padrão.

Neste caso, misturar 860 μL de HClO_4 70 % em água ultrapura q.s.p. 1000 mL.

METABISSULFITO DE SÓDIO 0,4mM

1. Dissolver 0,0076 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ em água ultrapura q.s.p. 100 mL.

EDTA SAL DISSÓDICO DIIDRATADO 0,1mM

1. Dissolver 0,00074 g de EDTA sal dissódico diidratado em água q.s.p. 20 mL.

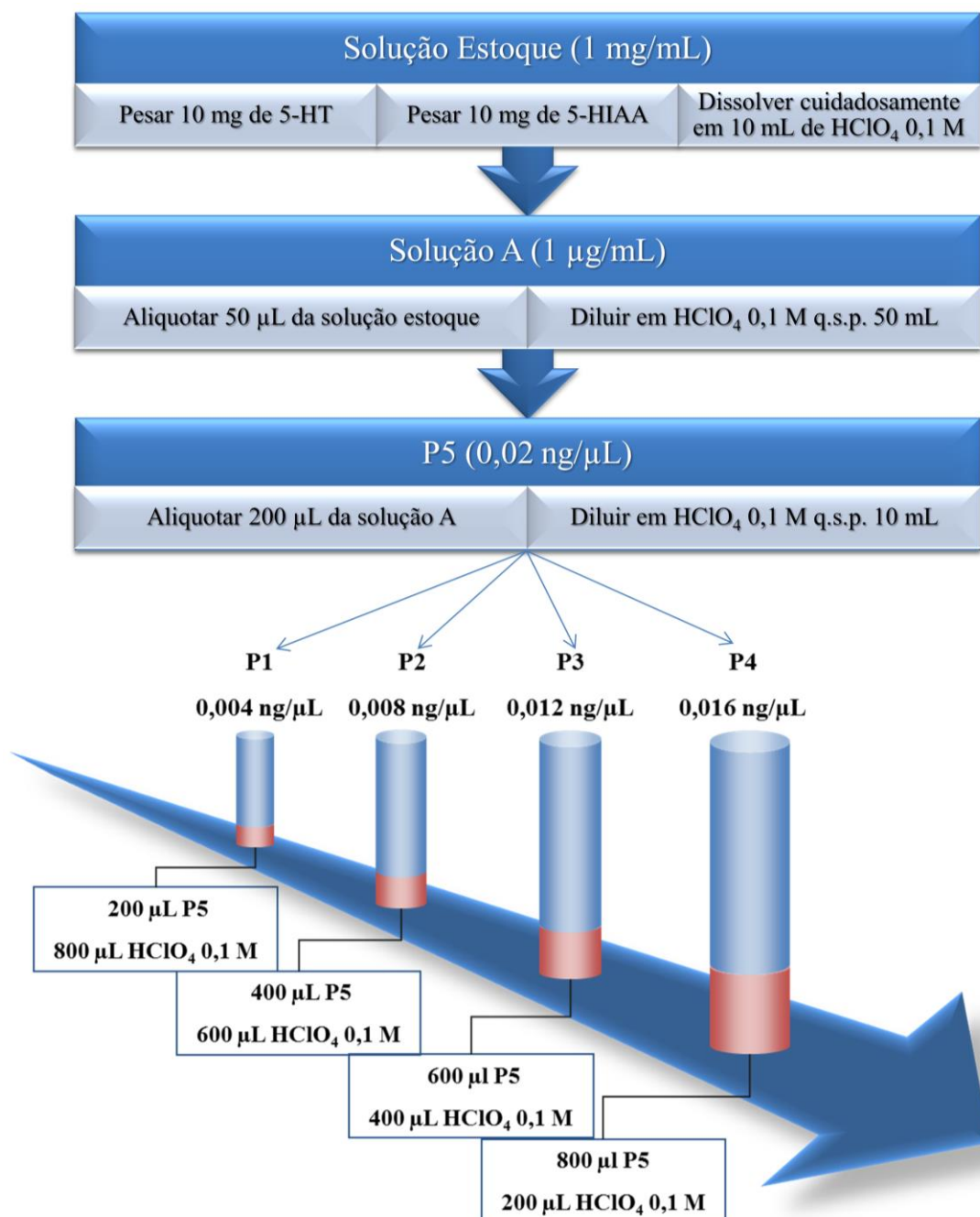
APÊNDICE B

PREPARO DA FASE MÓVEL

1. Pesar 10,5 g de ácido cítrico monoidratado (0,194 M), 8,3 g de acetato de sódio triidratado (0,243 M) e 0,0275 g de EDTA ($2,95 \times 10^{-4}$ M) e dissolver em 250 mL de água ultrapura.
2. Homogeneizar em agitador magnético e sonicar por 2 min.
3. Aferir para pH 4,0.
4. Adicionar 45 mL de metanol e aferir para 500 mL com água ultrapura no balão volumétrico.
5. Filtrar a vácuo e degaseificar em ultrassom por 20 min.

APÊNDICE C

PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DE 5-HT E 5-HIAA



APÊNDICE D

CONDIÇÕES DE ANÁLISE DO DETECTOR ELETROQUÍMICO

Potencial = + 0,640 V

Temperatura = 28 °C

Range = 50 nA

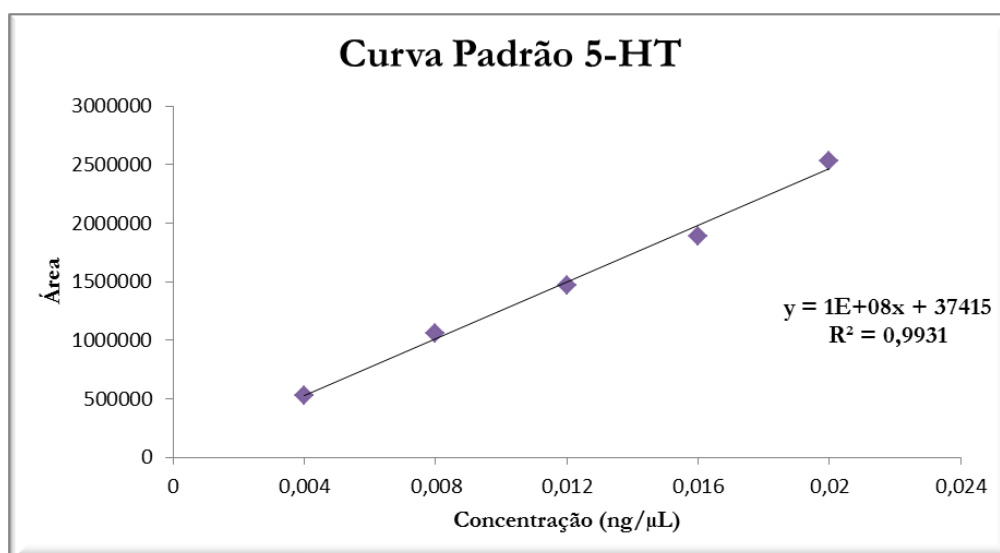
APÊNDICE E

DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 5-HT POR CLAE

5-HT					
Replicatas	Concentração (ng/μL)	Área	Tempo de retenção (min)	Média da área	Slope
P1.1	0,004	506742,4	4,102	523100,17	400000
P1.2		551052,8	4,103		
P1.3		511505,3	4,110		
P2.1	0,008	1191161,1	4,105	1053715,43	
P2.2		1017601,6	4,095		
P2.3		952383,6	4,089		
P3.1	0,012	1478219,9	4,083	1468865,97	
P3.2		1467251,4	4,097		
P3.3		1461126,6	4,095		
P4.1	0,016	2114443,6	4,090	1884239,30	
P4.2		1749656,9	4,081		
P4.3		1788617,4	4,089		
P5.1	0,020	2524347,3	4,083	2533181,27	
P5.2		2499627,9	4,096		
P5.3		2575568,6	4,098		

APÊNDICE F

CURVA DE CALIBRAÇÃO DA 5-HT POR CLAE



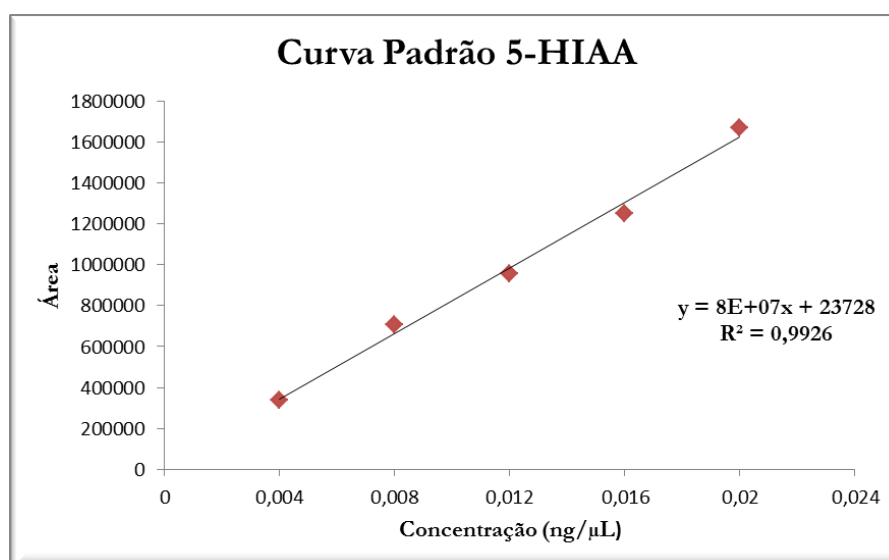
APÊNDICE G

DADOS DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO 5-HIAA POR CLAE

5-HIAA					
Replicatas	Concentração (ng/μL)	Área	Tempo de retenção (min)	Média da área	Slope
P1.1	0,004	347500,8	8,255	339157,83	45000
P1.2		346936,2	8,257		
P1.3		323036,5	8,266		
P2.1	0,008	803938,8	8,254	706006,00	
P2.2		675734,7	8,248		
P2.3		638344,5	8,232		
P3.1	0,012	934563,7	8,236	955345,50	
P3.2		961874,0	8,240		
P3.3		969598,8	8,243		
P4.1	0,016	1416764,8	8,237	1248067,30	
P4.2		1162519,8	8,227		
P4.3		1164917,3	8,234		
P5.1	0,020	1662100,8	8,228	1667159,80	
P5.2		1634917,5	8,238		
P5.3		1704461,1	8,241		

APÊNDICE H

CURVA DE CALIBRAÇÃO DO 5-HIAA POR CLAE



APÊNDICE I

CROMATOGRAMA REPRESENTATIVO DOS ANALITOS, NA
CONCENTRAÇÃO DE 0,004 ng/ μ L (P1)

